

Über die Strahleninaktivierung der Ribonuclease in Lösung

Helga Schübler

1976 No 436



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546220_0018

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

Über die Strahleninaktivierung der Ribonuclease in Lösung

Habilitationsschrift
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Helga Schüßler



UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ÜBER DIE STRAHLENINAKTIVIERUNG DER RIBONUCLEASE IN LÖSUNG

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Entwicklung und Aufgaben der molekularen Strahlenbiologie	1
1.2 Strahlenbiologie der Enzyme	3
1.3 Strahlenchemie	9
1.3.1 Strahlenchemie des Wassers	9
1.3.1.1 Das solvatisierte Elektron	11
1.3.1.2 Das $H^{\bullet}$ -Radikal	12
1.3.1.3 Das $OH^{\bullet}$ -Radikal	13
1.3.2 Strahlenchemie der Aminosäuren	14
1.3.3 Strahlenchemie der Peptide und Proteine	18
1.4 Problemstellung	22
2. Methodischer Teil	25
2.1 Reinigung der Ribonuclease	25
2.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität	25
2.2.1 Depolymerase-Aktivität	25
2.2.2 Hydrolase-Aktivität	26
2.3 Bestrahlung	27
2.3.1 Bestrahlung der Ribonuclease	27
2.3.2 Gasbedingungen während der Bestrahlung	27
2.3.3 Dosisbestimmung	28
2.4 Dosis-Effekt-Kurven	29
2.5 Gelfiltration	29
2.6 Aminosäureanalyse	30

2.7 Bestrahlungsversuche unter Verwendung von ^{14}C -markiertem Aethanol	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Kompetierende Radikalreaktionen	32
3.2 Die Wirkung des Abfangens von solvatisierten Elektronen auf die Strahleninaktivierung der Ribonuclease	33
3.2.1 Strahleninaktivierung von Ribonuclease unter N_2 und unter N_2O	33
3.2.2 Die Abhängigkeit der D_{37} von der Enzymkonzentration unter N_2 und N_2O	37
3.3 Die Wirkung des Abfangens von $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen auf die Strahleninaktivierung der Ribonuclease	40
3.3.1 Die Wahl der Fängersubstanz	40
3.3.2 Strahleninaktivierung von Ribonuclease in Gegenwart von 10^{-2} M Aethanol	43
3.4 Die Wirkung des Abfangens von $\text{H}^\bullet$ -Radikalen auf die Strahleninaktivierung der Ribonuclease	47
3.5 Strahleninaktivierung der Ribonuclease beim Abfangen der Primärradikale durch N_2O und Aethanol	49
3.6 Interpretation der Meßergebnisse nach der Gleichung von Sanner und Pihl	53
3.7 Interpretation der Meßergebnisse nach dem Verfahren von Mee, Adelstein und Stein	56
3.8 Berechnung der Effektivitäten der Primärradikale unter Berücksichtigung der Verunreinigungen	62
3.9 Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung der Ribonuclease durch Radiolyse in Gegenwart von Fängersubstanzen	65
3.10 Über die Aggregation der Ribonuclease durch Radiolyse	77
3.11 Nachweis der Reaktion der Aethanolradikale mit Ribonuclease	84

4. Diskussion	88
4.1 Effektivität der Radikale bei der Inaktivierung von Ribonuclease	88
4.2 Strahleninduzierte Veränderungen am Molekül und ihre Korrelation zur Inaktivierung	94
4.3 Unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der beiden enzymatischen Funktionen	101
5. Zusammenfassung	104
Literaturverzeichnis	107

1. Einleitung

1.1 Entwicklung und Aufgaben der molekularen Strahlenbiologie

Bei der Einwirkung von ionisierender Strahlung auf einen Organismus unterscheidet man verschiedene zeitliche Phasen der Strahlenwirkung, die nacheinander ablaufen. In der ersten - der physikalischen Phase - wird die Strahlenenergie von dem System absorbiert, während in der darauffolgenden physiko-chemischen Phase Moleküle angeregt werden und Ionen und Radikale entstehen. Dann - in der chemischen Phase - kommt es zu Reaktionen der Radikale untereinander und zu Umlagerungen der Moleküle. Diese Prozesse sind bereits nach 10^{-6} Sekunden beendet und resultieren in veränderten Molekülen, die dann in den Stoffwechsel des bestrahlten Organismus eingehen. In der anschließenden biologischen Phase, die sich über mehrere Jahre erstrecken kann, kommt es zu biochemischen Veränderungen sowie submikroskopischen und sichtbaren Schäden des Organismus, die bei starken Veränderungen zum Zelltod und unter Umständen zum Tod des Organismus führen können. Die Prozesse, die bei der Strahleneinwirkung zum veränderten Molekül führen, sind sehr schnell und daher der Untersuchung nur schwer zugänglich. Erst seit etwa 10 Jahren bietet die Pulsradiolyse eine Möglichkeit, Radikalreaktionen, die im Mikrosekundenbereich ablaufen, zu beobachten und ihre Geschwindigkeitskonstanten zu messen. Über die resultierenden molekularen Veränderungen können dabei nur aufgrund von UV-Absorptionsspektren Aussagen gemacht werden, die meist unsicher sind und sich nur auf wenige Molekülgruppen beziehen. Die nach Abschluß der chemischen Phase veränderten Moleküle sind jedoch stabil, und sie lassen sich mit den üblichen chemischen Methoden untersuchen. Aufgrund der dabei gefundenen molekularen Veränderungen kann man dann auf Mechanismen bei der Strahleneinwirkung schließen. Durch Untersuchungen des Einflusses von veränderten Strahlenbedingungen auf die molekularen Reaktionen lassen sich weitere Aussagen über die Strahleneinwirkung machen. Man hofft durch derartige Untersuchungen auch das Prinzip für die Strahlenensibilisierung und den Strahlenschutz

von Substanzen zu erkennen, was von großer Bedeutung für die Strahlentherapie wäre. Aufgrund der biologischen Veränderungen ohne Kenntnis der molekularen Prozesse die Mechanismen der Strahlenwirkung zu erkennen, bietet wenig Aussicht auf Erfolg. So begann die molekulare Strahlenbiologie zunächst also mit der Aufgabe, durch Untersuchung der strahleninduzierten Veränderungen an den für den Lebensprozeß wichtigen Stoffen, wie Nucleinsäuren und Enzymen, zur Aufklärung der Strahlenwirkung auf Organismen beizutragen.

Mit dieser Aufgabenstellung entwickelte sich zunächst die molekulare Strahlenbiologie, die nun aber in letzter Zeit zunehmend auch Bedeutung für die biochemische Forschung erlangt. Zu Beginn war bei den Untersuchungen allein die Relation der Dosis zum Verlust der biologischen Aktivität dominierend. Doch mit zunehmenden Kenntnissen in der Strahlenchemie und mit Verbesserung der biochemischen Untersuchungsmethoden sollte es möglich werden, zu erkennen, welche strahleninduzierte molekulare Veränderung eine Inaktivierung des Biomoleküls bedingt. Damit ist die Strahlenbiologie zu einer ähnlichen Fragestellung gekommen, wie sie auch von der biochemischen Forschung behandelt wird: welche Bedeutung hat eine bestimmte molekulare Anordnung für den biologischen Mechanismus? Der Unterschied besteht nur darin, daß in der Biochemie die strukturelle Änderung auf chemischem Wege herbeigeführt wird, während in der molekularen Strahlenbiologie die Strahlung das verändernde Agens ist. Da aber meistens bei der Einwirkung von ionisierenden Strahlen die Anzahl der molekularen Veränderungen sehr groß ist, ist das Auffinden einer eindeutigen Korrelation von struktureller Veränderung und Inaktivierung sehr schwierig. Daher gehen die Bemühungen nun dahin, solche Bestrahlungsbedingungen zu finden, bei denen nur noch eine begrenzte Anzahl von Reaktionen auftreten kann.

Die molekulare Strahlenbiologie hat heute vor allem zwei Aufgaben:

1. Die Erforschung der Strahleneinwirkung auf die Zellbausteine und die Zelle.

2. Untersuchung von strahleninduzierten Modifikationen der Moleküle im Zusammenhang mit der biologischen Aktivität, um Aufschluß über die Wirkungsweise von Biomolekülen zu bekommen.

1.2 Strahlenbiologie der Enzyme

Proteine und Nucleinsäuren sind die wichtigsten Bestandteile der Zelle und für die Aufrechterhaltung des Lebensprozesses notwendig. Deswegen fanden diese beiden Substanzen das besondere Interesse der strahlenbiologischen Untersuchungen. Da die vorliegende Arbeit sich mit der Strahleninaktivierung eines Enzyms beschäftigt, soll der Beschreibung der eigenen Untersuchungen ein Überblick über die Strahlenbiologie der Enzyme vorangestellt werden.

Die Untersuchungen der Strahleneinwirkung auf Proteine begann etwa 1927 mit der Arbeit von Fricke /1/ über die Bestrahlung einer wäßrigen Hämoglobininlösung. Dabei fand man, daß bei der Einwirkung ionisierender Strahlung das zweiwertige Eisen des Hämoglobins oxidiert wird und die biologische Aktivität verloren geht. Es zeigte sich, daß dieser Verlust nicht eine lineare Funktion von der Dosis ist - wie z.B. die Oxidation des Fe^{II} zu Fe^{III} bei der Eisensulfatlösung - sondern eine exponentielle Funktion. Diese exponentielle Abhängigkeit der Inaktivierung von der Dosis fand man dann bei der Untersuchung zahlreicher Enzyme. Sie läßt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$\frac{E}{E_0} = e^{-bD} \quad (1)$$

Dabei ist: E_0 = Anfangskonzentration des aktiven Enzyms

E = Konzentration der aktiven Enzymmoleküle nach der Dosis D

$b = \frac{1}{D_{37}}$ D_{37} - die Dosis, bei der noch 37 %

Restaktivität vorhanden sind.

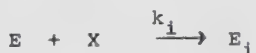
Zur Erklärung dieses Verhaltens nimmt Fricke bereits an, daß die Wechselwirkung der ionisierenden Strahlung nicht direkt mit dem Molekül, sondern mit dem Wasser stattfindet. Dieses durch Strahlung "aktivierte Wasser" reagiert dann mit den gelösten Molekülen und kann sie dabei inaktivieren. Da aber auch die bereits inaktivierten Moleküle weiter mit dem "aktivierten Wasser" reagieren, muß der gemessene Effekt des Verlustes von biologischer Aktivität mit zunehmender Dosis exponentiell abnehmen.

Diese Arbeiten wurden im wesentlichen von Dale /2/ fortgeführt und seine Untersuchungen trugen zur weiteren Klärung der Begriffe "indirekte und direkte Strahlenwirkung" bei. Dale untersuchte die Abhängigkeit der Inaktivierungsdosis von der Konzentration der Enzymlösung und fand, daß über einen weiten Konzentrationsbereich des Enzyms die Anzahl der pro Dosis inaktivierten Enzymmoleküle unabhängig ist. Daraus ergibt sich, daß die prozentuale Veränderung bei gleicher Dosis bei einer verdünnten Lösung größer ist als bei einer konzentrierten Lösung. Diese erhöhte Strahlenempfindlichkeit sehr verdünnter Lösungen wurde "Verdünnungseffekt" genannt /3/. Nach Dale wird entsprechend der Dosis eine bestimmte Menge von aktivierten Wassermolekülen produziert, die dann stöchiometrisch mit Proteinmolekülen reagieren. Je höher die Enzymkonzentration ist, um so größer ist der Prozentsatz der Enzymmoleküle, für die kein aktiviertes Wassermolekül zur Verfügung ist. Wäre die Einwirkung der Strahlung direkt und nicht indirekt über das Wasser, so wäre der Prozentsatz der umgewandelten Moleküle unabhängig von der Konzentration. Im Gebiet von sehr verdünnten Lösungen steigt die Inaktivierungsdosis an, da die aktivierten Wassermoleküle miteinander oder mit Verunreinigungen reagieren, bevor sie ein Proteinmolekül erreichen. Bei sehr konzentrierten Enzymlösungen steigt die Strahlenempfindlichkeit wieder an, da unter diesen Bedingungen auch direkte Strahlenwirkung auftritt, d.h. die Enzymmoleküle selbst absorbieren die Energie und verlieren dabei ihre biologische Aktivität. Ein weiterer Beweis für die indirekte Strahlenwirkung ist, daß bei Zusatz von Substanzen

zur Enzymlösung ein Strahlenschutz auftreten kann, der durch Konkurrenzreaktionen bedingt ist /4/.

Mit den Arbeiten von Weiss /5/, Dainton und Peterson /6/, Hart und Boag /7/ und Keene /8/ konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß bei der Einwirkung von ionisierender Strahlung auf wäßrige Lösung Wasserradikale entstehen, und zwar $\text{OH}^\cdot$ - und $\text{H}^\cdot$ -Radikale, sowie solvatisierte Elektronen. Damit fanden die Annahme von Fricke und Dale, daß die Strahleninaktivierung der Enzyme in Lösung nicht durch direkte Absorption der Strahlenenergie, sondern indirekt durch Reaktion mit veränderten Wassermolekülen erfolgt, eine experimentelle Bestätigung.

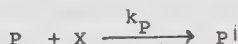
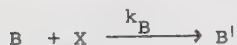
1959 formulierten Hutchinson und Ross /9/ und Augenstein /10/ eine Reaktionskinetik für den indirekten Effekt der Enzyminaktivierung. Diese Überlegungen wurden dann von Sanner und Pihl /11,12/ weitergeführt. Diese Autoren machen folgende Voraussetzungen für die Ableitung ihrer reaktionskinetischen Gleichung: Die beim Bestrahlen einer wäßrigen Lösung entstehenden Radikale $\text{X}_1, \text{X}_2, \dots \text{X}_j$ inaktivieren mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten ($k_{i1}, k_{i2}, \dots k_{ij}$) das Enzym. Da aber nicht bekannt ist, wie groß der Anteil der einzelnen Radikale an der Inaktivierung ist, wird zunächst einmal angenommen, daß die Inaktivierung bevorzugt von einer Radikalsorte bewirkt wird. Die Inaktivierungsreaktion durch die Radikale X verläuft mit einer Geschwindigkeitskonstante k_i :



Die Radikale reagieren mit dem Enzym mit einer Geschwindigkeitskonstante k_E . Durch diese Reaktion kann, aber muß nicht, Inaktivierung hervorgerufen werden.



Die Radikale verschwinden ebenfalls durch Reaktionen mit dem inaktivierten Enzym (E_i), mit der Puffersubstanz und Verunreinigungen (B) und mit den Schutzsubstanzen (P):



Die Inaktivierungsgeschwindigkeit des Enzyms wird durch folgende Gleichung gegeben:

$$\frac{dE}{dt} = -k_i X E \quad (2)$$

Die Geschwindigkeit für den Konzentrationswechsel der Wasser-radikale

$$\frac{dX}{dt} = I - k_E X E - k_{Ei} X (E_O - E) - k_P X P - k_B X B \quad (3)$$

Daraus ergibt sich:

$$X = \frac{I - \frac{dX}{dt}}{k_E E + k_{Ei} (E_O - E) + k_P P + k_B B}$$

Da $\frac{dX}{dt}$ verglichen mit I sehr klein ist, kann $\frac{dX}{dt}$ Null gesetzt werden. Für X wird nach Gleichung (2)

$$\frac{\frac{dE}{dt}}{k_i E}$$

in Gleichung (3) eingesetzt und man erhält:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{k_i I \cdot E}{k_E E + k_{Ei} (E_O - E) + k_P P + k_B B} \quad (4)$$

Setzt man nun die Konzentration des inaktivierten Enzyms gleich y, so erhält man den Ausdruck $E = E_O - y$, den man in die Gleichung (4) einsetzt. Durch Integration von $t = 0$ bis $t = t$ erhält man daraus:

$$I_t = \frac{1}{k_i} \left[(k_E - k_{Ei}) y + (k_{Ei} E_O + k_P P + k_B B) \ln \frac{E_O}{E_O - y} \right] \quad (5)$$

Führt man für $I_t = \alpha \cdot D$ ein, wobei α der Proportionalitätsfaktor für die pro Dosiseneinheit gebildeten Radikale und D die Dosis ist, so kann man Gleichung (5) weiter umformen in:

$$\alpha \cdot D = \frac{k_E - k_{Ei}}{k_i} y + \frac{k_{Ei} E_O + k_P P + k_B B}{k_i} \ln \frac{E_O}{E_O - y} \quad (6)$$

Von Sanner und Pihl wurde nun angenommen, daß das inaktivierte Enzym mit der gleichen Geschwindigkeit wie das aktive Enzym mit den Wasserradikalen reagiert, dann ist $k_E = k_{Ei}$ und man erhält:

$$\alpha \cdot D = \left(\frac{k_E}{k_i} \cdot E_O + \frac{k_P}{k_i} P + \frac{k_B}{k_i} B \right) \ln \frac{E_O}{E} \quad (7)$$

für die D_{37} ergibt sich daraus:

$$D_{37} = \frac{k_E}{\alpha \cdot k_i} \cdot E_O + \frac{k_P}{\alpha \cdot k_i} P + \frac{k_B}{\alpha \cdot k_i} \cdot B \quad (8)$$

Verhält sich die Strahleninaktivierung gemäß dieser Gleichung, so steigt die D_{37} mit der Enzymkonzentration an. Die Steigung der Geraden, die man erhält, wenn man die D_{37} -Werte über die Anfangskonzentration des Enzyms aufträgt, ist bestimmt durch das Verhältnis k_E zu k_i und soll nicht durch den Zusatz von Schutzstoffen verändert werden, wenn die Schutzwirkung allein durch das Wegfangen von den inaktivierenden Wasserradikalen verursacht wird.

Aufgrund der heute bekannten Geschwindigkeitskonstanten für die Radiolyse kann man Substanzen auswählen, die sehr schnell und spezifisch mit $OH^\cdot$ - oder $H^\cdot$ -Radikalen oder mit den solvatisierten Elektronen reagieren. Diese Radikalfänger kann man Enzymlösungen zusetzen und aus dem erhaltenen Schutz bei der Strahleninaktivierung läßt sich auf die Wirksamkeit des abgefangenen Radikals für die Inaktivierung des Enzyms schließen.

Da fast immer eine exponentielle Abhängigkeit der Inaktivierung

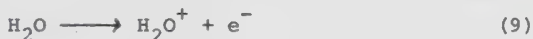
von der Dosis gefunden wurde, hat man zunächst angenommen, daß eine spezifische Reaktion am Molekül zur Inaktivierung ausreicht. Bei Untersuchungen an bestrahlten Enzymmolekülen hat man jedoch immer verschiedene Veränderungen beobachten können, die aber nicht in Korrelation zur Inaktivierung gesetzt werden konnten. Da Cystin besonders strahlenempfindlich ist und der Cystingehalt in bestrahlten Enzymlösungen stark abnimmt, wurde in zahlreichen Arbeiten /13/ die Ansicht vertreten, daß die Spaltung der Disulfidbrücken und der damit verbundene Verlust der nativen Konformation die Inaktivierung bedingt /14/. Von uns konnte aber nachgewiesen werden /15/, daß dieser Reaktion nicht diese Bedeutung zukommt. Auch weitere strahlenchemische Veränderungen, die im nächsten Abschnitt ausführlich behandelt werden, wie z.B. der Abbau eines bestimmten Aminosäurerestes, konnten nicht in Korrelation zur Inaktivierung gebracht werden. Trotz der exponentiellen Dosis-Effekt-Kurve kann es sich bei der Strahleninaktivierung um keinen reinen Alles-oder-Nichts-Prozeß handeln, da man unter den Bestrahlungsprodukten Moleküle findet, die chemisch durch die Radio-lyse verändert sind, aber noch einen Teil enzymatischer Aktivität haben /16/, /17/. Weitere latente Schäden, die die Enzym-moleküle durch die Bestrahlung erleiden und die zunächst sich noch nicht im Verlust der enzymatischen Aktivität zeigt, werden sichtbar, wenn man an bestrahlten Enzymlösungen die thermische Denaturierung untersucht /18/.

Der überwiegende Teil der bisherigen Untersuchungen über die Wirkung ionisierender Strahlung auf Enzyme ist ohne Einbeziehung der Strahlenchemie durchgeführt worden. Erst in letzter Zeit werden strahlenchemische Methoden zur Aufklärung der molekularen Mechanismen bei der Enzyminaktivierung herangezogen. Da in der vorliegenden Arbeit bei allen Überlegungen und bei der Deutung der Versuchsergebnisse die Strahlenchemie eine große Rolle spielt, wird zum besseren Verständnis der Teil der Strahlenchemie, der für diesen biologischen Bereich wichtig ist, im folgenden Kapitel zusammengestellt.

1.3 Strahlenchemie

1.3.1 Strahlenchemie des Wassers

Untersucht man die Einwirkung ionisierender Strahlung auf die wässrige Lösung einer Substanz, so findet die hauptsächliche Wechselwirkung der Strahlung mit dem Wasser statt, und die dabei entstehenden reaktiven Teilchen werden dann mit der gelösten Substanz reagieren. Man kennt heute zwei Primärprozesse bei der Radiolyse des Wassers. Bei dem einen Prozeß handelt es sich um die Ionisation des H_2O -Moleküls, wobei ein Elektron entsteht, das innerhalb von 10^{-11} Sekunden eine Wasserhülle um sich aufbaut und dann als hydratisiertes Elektron nachweisbar ist /7/, /8/.

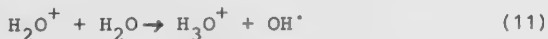


Bei dem anderen Prozeß entsteht unter Einwirkung von Strahlung ein angeregtes H_2O -Molekül, das in 2 Radikale zerfällt.



Die nach Gleichung (10) entstandenen $\text{H}^\cdot$ -Radikale werden auch mit H^{α} bezeichnet.

Das in Gleichung (9) angegebene H_2O^+ -Ion ist chemisch nicht nachweisbar. Man nimmt an, daß es bereits nach 10^{-14} Sekunden nach folgender Gleichung weiterreagiert:



Auch das solvatisierte Elektron reagiert mit den Wassermolekülen nach folgender Gleichung weiter:



allerdings mit einer sehr kleinen Geschwindigkeitskonstante von $20 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Die Lebensdauer des Elektrons in reinem Wasser ist durch diese Reaktion begrenzt. Seine Halbwertszeit be-

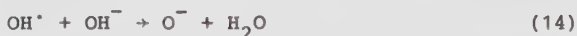
trägt etwa 600 μsec .

Die Menge der solvatisierten Elektronen wie auch der $\text{OH}^\bullet$ -Radikale hängt weiterhin vom pH-Wert der Lösung ab. So wird in saurer Lösung mit einer Geschwindigkeitskonstante von $2,3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ das solvatisierte Elektron in ein $\text{H}^\bullet$ -Radikal umgewandelt:



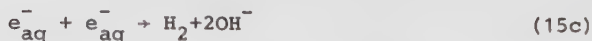
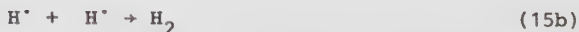
Die nach dieser Gleichung entstandenen H-Radikale werden auch als H^β bezeichnet.

Der pk-Wert für das solvatisierte Elektron liegt bei 9,7. Daher liegen im sauren Gebiet keine Elektronen mehr vor, und $\text{OH}^\bullet$ - und $\text{H}^\bullet$ -Radikale reagieren mit der gelösten Substanz. Die $\text{OH}^\bullet$ -Radikale reagieren sehr schnell mit $k = 6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ mit OH^- unter Bildung von O^- .



Die letzten beiden Gleichungen machen deutlich, daß für die Ausbeute der Radiolyseprodukte des Wassers die Einstellung des pH-Wertes sehr wichtig ist.

Die entstandenen Primärprodukte aus der Radiolyse des Wassers können unter Kombination molekulare Zersetzungsprodukte des Wassers bilden:



Diese molekularen Zersetzungsprodukte entstehen in hohen Ausbeuten bei ionisierenden Strahlen mit hohem LET^* . Bei Co- γ -

* $\text{LET} = \text{linear energy transfer}$

Strahlung und bei der in dieser Arbeit verwendeten 200 kV-Röntgenstrahlung läßt sich nur wenig H_2O_2 und H_2 nachweisen. Die quantitative Bestimmung der radikalischen Primärprodukte bei der Radiolyse des Wassers erfolgte mit Substanzen, die spezifisch mit einem Radikal reagieren und aus der Menge des entstandenen Produktes kann man auf den G-Wert* schließen, mit dem das radikalische Zwischenprodukt aus dem Wasser gebildet wird. Heute gelten folgende G-Werte für die Radiolyse des Wassers bei pH 7,0 mit Strahlen niedriger LET /19/:

$$G(e_{aq}^-) = 2,65$$

$$G(H^\bullet) = 0,58$$

$$G(OH^\bullet) = 2,70$$

$$G(H_2) = 0,45$$

$$G(H_2O_2) = 0,70$$

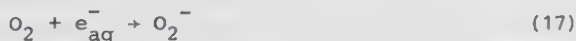
Hieraus ergibt sich, daß insgesamt 4,1 Wassermoleküle pro 100 eV absorbiertener Energie verändert wird.

$$G(-H_2O) = G(e_{aq}^-) + G(H^\bullet) + 2 G(H_2) \quad (16)$$

$$4,13 = 2,65 + 0,58 + 2 \cdot 0,45$$

1.3.1.1 Das solvatisierte Elektron

Das solvatisierte Elektron reagiert im allgemeinen mit Gruppen von hoher Elektronenaffinität. So z.B. mit Sauerstoff nach folgender Gleichung:



* G-Wert = $\frac{\text{Zahl der gebildeten (oder verbrauchten) Moleküle}}{\text{absorbierte Strahlenenergie in eV}} \times 100$

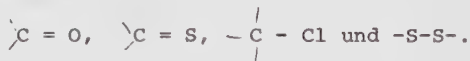
mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $1,9 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

Sehr wichtig für strahlenchemische Untersuchungen ist auch die folgende Reaktion, die mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $8,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ abläuft:



Die solvatisierten Elektronen können so abgefangen werden und ihre Reaktionen mit Proteinen verhindert werden. Da an Stelle der solvatisierten Elektronen nach Gleichung (18) zusätzliche $\text{OH}^\bullet$ -Radikale entstehen, werden alle Reaktionen, die durch $\text{OH}^\bullet$ -Radikale bewirkt werden, in Gegenwart von N_2O verstärkt auftreten. Statt der reduzierenden Wirkung der solvatisierten Elektronen hat man also unter diesen Bedingungen die oxidierende Wirkung der $\text{OH}^\bullet$ -Radikale.

Ferner reagiert das solvatisierte Elektron sehr schnell mit folgenden Gruppen in Aliphaten:



Reaktionen mit Aromaten finden nur statt, wenn durch Substitution eine elektrophile Gruppierung entsteht.

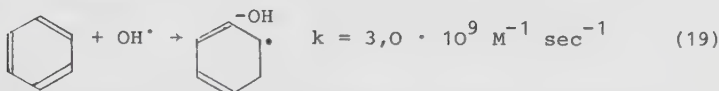
1.3.1.2 Das $\text{H}^\bullet$ -Radikal

Das $\text{H}^\bullet$ -Radikal kann wie das solvatisierte Elektron reduzierend wirken. In neutraler Lösung entstehen $\text{H}^\bullet$ -Radikale bei der Radiolyse des Wassers nur in kleiner Ausbeute, aber in saurer Lösung ist ihre Konzentration wegen der nach Gleichung (13) verlaufenden Umwandlung der solvatisierten Elektronen in $\text{H}^\bullet$ -Radikale bedeutend höher, und alle Reduktionen sind unter diesen Bedingungen durch $\text{H}^\bullet$ -Radikale bedingt. Im Gegensatz zum Elektron kann sich das $\text{H}^\bullet$ -Radikal an Doppelbindungen anlagern. Es kann weiterhin einem Molekül ein H-Atom entreißen, wobei Wasserstoff entsteht. Diese Reaktion verläuft besonders schnell

mit tertiären und langsamer mit sekundären und primären H-Atomen. Mit N_2O reagiert das $H^\bullet$ -Radikal außerordentlich langsam ($k = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$).

1.3.1.3 Das $OH^\bullet$ -Radikal

Das $OH^\bullet$ -Radikal gilt als ein elektrophiles Reagenz und reagiert folglich an Stellen von hoher Elektronendichte, so lagert es sich an Doppelbindungen in Aliphaten und Aromaten an:



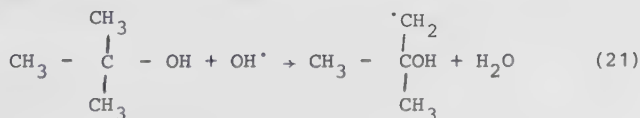
Da die C-H-Bindungen in organischen Molekülen schwächer sind als die H-OH-Bindungen, kann das $OH^\bullet$ -Radikal H-Atome aus chemischen Verbindungen abspalten. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion hängt von der Struktur ab. Besonders leicht werden Wasserstoffatome von C-Atomen abgespalten, die eine funktionelle Gruppe tragen:



$$k = 1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

Da im Gegensatz dazu die solvatisierten Elektronen kaum meßbar mit Aethanol reagieren ($k < 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) und auch die Reaktion mit $H^\bullet$ -Radikalen sehr langsam ist ($k = 1,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) wird Aethanol häufig verwendet, um $OH^\bullet$ -Radikale abzufangen.

Sehr häufig wird auch t-Butanol als $OH^\bullet$ -Fänger verwendet:



$$k = 2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

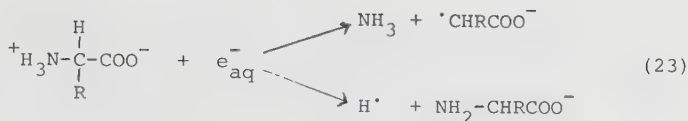
Das $\text{OH}^\bullet$ -Radikal kann auch ein weiteres Elektron aufnehmen, wodurch viele organische und anorganische Anionen oxidiert werden:



Diese Reaktion verläuft bei pH 1 mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, im neutralen Gebiet ist sie nicht meßbar. Da Untersuchungen an Proteinen in Pufferlösungen durchgeführt werden müssen, um Nebeneffekte durch pH-Änderungen auszuschließen, wurde in dieser Arbeit als Puffersubstanz Phosphat gewählt, das sehr langsam mit $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen reagiert. Für die Reaktion $\text{HPO}_4^{--} + \text{OH}^\bullet$ liegt die Geschwindigkeitskonstante unter $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1} / 20/$.

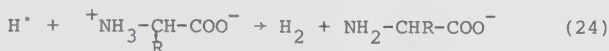
1.3.2 Strahlenchemie der Aminosäuren

Bei einer Untersuchung über die Strahleninaktivierung von Enzymen ist die Kenntnis der Reaktionen der Aminosäuren mit den Primärprodukten aus der Radiolyse des Wassers wichtig. Die Literatur über die Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf Aminosäuren wurde erstmals 1964 von J. Lieberman und J. Kopoldova /21/ zusammengestellt und beschrieben. 1968 erschien ein weiterer Übersichtsartikel über die Strahlenchemie von organischen Stickstoffverbindungen von W.M. Garrison /22/, in dem die wichtigsten bekannten Reaktionen bei der Bestrahlung von Aminosäurelösungen formuliert werden. Weitere Untersuchungen mit Hilfe der Pulsradiolyse /23/ an aliphatischen Aminosäuren ermöglichen es, nun folgende Reaktionen für die funktionellen Gruppen der Aminosäuren $^+\text{NH}_3 - \underset{\text{R}}{\text{CH}} - \text{COO}^-$ zu formulieren: Das solvatisierte Elektron reagiert mit aliphatischen Aminosäuren unter Desaminierung oder unter Abspaltung von $\text{H}^\bullet$ aus der NH_3 -Gruppe



Diese Reaktionen verlaufen relativ langsam. Bei allen aliphatischen Aminosäuren wurden für die Reaktion mit solvatisierten Elektronen nur Geschwindigkeitskonstanten unterhalb von $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ gefunden /24/.

Das H-Radikal reagiert ähnlich mit der positiven NH_3 -Gruppe wie das solvatisierte Elektron unter Bildung von Wasserstoff:

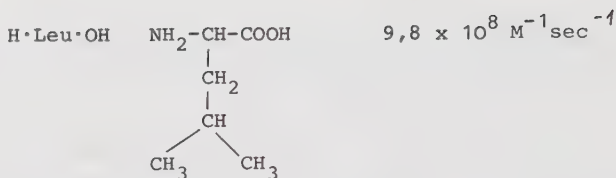


Wie im vorhergehenden Abschnitt schon beschrieben wurde, ist eine der wichtigsten Reaktionen des $\text{OH}^\cdot$ -Radikals die Abspaltung des H-Atoms aus organischen Verbindungen, die auch bei der Reaktion mit den aliphatischen Aminosäuren wesentlich ist. Die $\text{OH}^\cdot$ -Radikale greifen alle aliphatischen Aminosäuren am α -Atom an:

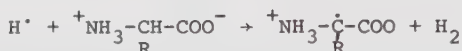


Bei Aminosäuren mit längeren aliphatischen Ketten kann die Abspaltung von H auch an anderen Stellen erfolgen, wobei aber auch hier die allgemeine Regel gilt, daß die Abspaltung vom tertiären C-Atom vor dem sekundären oder primären C-Atom bevorzugt ist. Diese Reaktionen der $\text{OH}^\cdot$ -Radikale ist zwar sehr langsam, aber mit Zunahme der Kettenlänge, d.h. mit Zunahme der möglichen Reaktionen werden die Geschwindigkeitskonstanten größer

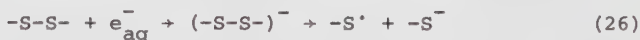
H·Gly·OH	$\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$1,0 \times 10^7$	$(\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1})$
H·Ala·OH	$\text{NH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{COOH}$	$1,2 \times 10^8$	"
H·Val·OH	$\text{NH}_2-\underset{\text{CH}(\text{CH}_3)_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	$4,2 \times 10^8$	"



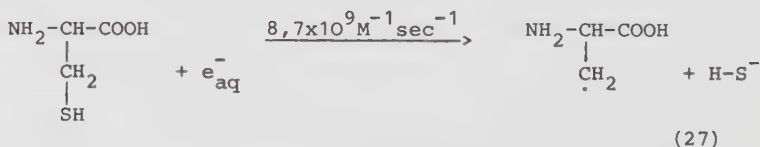
Das H-Radikal kann ebenso wie das OH[•]-Radikal ein H-Atom vom C_α-Atom abspalten:



Für alle Reaktionen der aliphatischen Aminosäuren mit Wasser-radikalen wurden relativ kleine Geschwindigkeitskonstanten gemessen. Erst wenn die Seitenketten R Molekülgruppen enthalten, die eine große Reaktivität gegenüber einem Primärprodukt hat, wird die Reaktion bedeutend schneller. So reagiert das solvatisierte Elektron mit Cystin im neutralen pH-Bereich außerordentlich schnell mit $k=1,3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$. Die reaktionsfähige Stelle ist dabei die Disulfidgruppe, die durch Einwirkung des Elektrons in ein S-Radikal und Sulfidion gespalten wird:



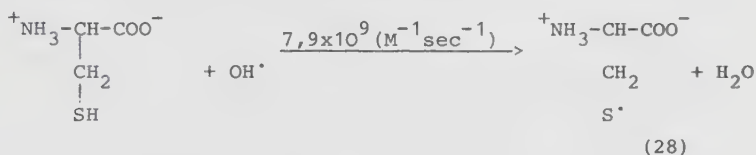
Auch Cystein reagiert sehr schnell mit Elektronen unter Bildung von Sulfidionen:



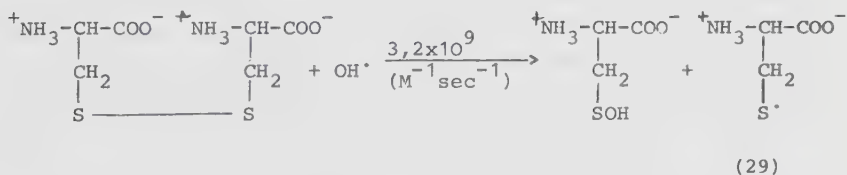
Die Reaktionen dieser beiden schwefelhaltigen Aminosäuren mit solvatisierten Elektronen verlaufen etwa einhundert mal schneller als die mit allen anderen Aminosäuren, mit Ausnahme des Histidins, das eine Geschwindigkeitskonstante von $3,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ hat.

Wie aus den allgemeinen Reaktionen des OH[•]-Radikals zu erwar-

ten ist, reagiert dieses Radikal leicht mit den aromatischen Seitenketten der Aminosäuren unter Anlagerung an die Doppelbindung. Diese Reaktionen verlaufen mit Geschwindigkeitskonstanten von $3-9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ /25/. Die Hydroxylierung kann beim Phenylalanin in o-, m-, p-Stellung erfolgen /26/. Das Haupthydroxylierungsprodukt des Tyrosins ist 3,4-Dihydroxyphenylalanin /27/. Auch die schwefelhaltigen Aminosäuren reagieren relativ schnell mit $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen /25/. Beim Cystein bildet sich unter Entzug des H-Atoms ein S-Radikal, das dann zu einer neuen inter- oder intramolekularen Disulfidbrücke reagiert.



Durch Einwirkung von $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen wird die S-S-Brücke des Cysteins gespalten:



Nimmt das S-Radikal wieder ein $\text{H}^\bullet$ -Radikal auf, so kann sich das Cystein wieder zurückbilden. Methionin, das von solvatisierten Elektronen nur sehr langsam angegriffen wird, ($k = 3,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$), reagiert mit $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $4,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Dabei entsteht vor allem α -Aminobuttersäure, Methioninsulfoxid und Methioninsulfon /28/. Die übrigen Aminosäuren zeigen gegenüber OH -Radikalen im Mittel eine höhere Reaktivität als gegenüber den solvatisierten Elektronen. Bei den Reaktionen mit $\text{OH}^\bullet$ liegen die Geschwindigkeitskonstanten der weniger reaktionsfähigen Aminosäuren immerhin noch um $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, da bei allen Molekülen der Entzug von $\text{H}^\bullet$ -Radikalen durch die $\text{OH}^\bullet$ -Radikale möglich ist. Daraus ergibt sich, daß die Reaktionen der $\text{OH}^\bullet$ -Radikale nicht die hohe Spezi-

fität haben, wie sie bei den solvatisierten Elektronen vorliegt, bei denen die Geschwindigkeitskonstanten der reaktiven und reaktionsträgen Aminosäuren sich um einen Faktor 100 unterscheiden, während der Unterschied bei den OH'-Radikalen höchstens einen Faktor 10 ausmacht.

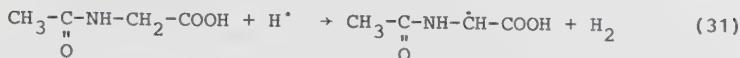
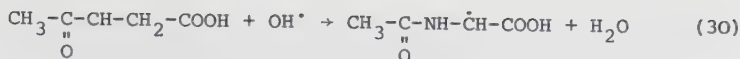
Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen der H-Radikale mit Aminosäuren wurden bis jetzt kaum gemessen. Es ist nur bekannt, daß die Reaktionen des Cysteins mit $k > 1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ und die des Tyrosins mit $k = 4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ verläuft.

1.3.3 Strahlenchemie der Peptide und Proteine

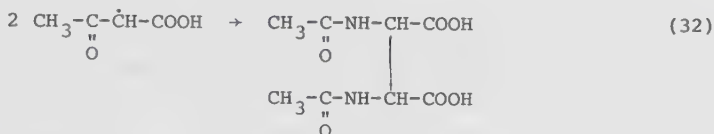
Die Radiolyse der Peptide wird weitgehend bestimmt von der Strahlenempfindlichkeit ihrer Aminosäuren. Je größer die Peptide sind, um so weniger wichtig wird die Desaminierung der Aminoendgruppe, die durch die solvatisierten Elektronen und H'-Radikale hervorgerufen wird. Wichtig für die Radiolyse der Peptide und Proteine bleibt das Verhalten der Seitenketten gegenüber den Wasserradikalen. Ob ihre Reaktivität durch den Einbau im Protein unverändert ist oder ob sterische Behinderungen auftreten können, ist noch fraglich.

Die charakteristische Gruppe für Peptide und Proteine ist die Peptidgruppe $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}-$, über die die Aminosäurereste untereinander verknüpft sind. Da diese Gruppe im Protein sehr viel häufiger vorkommt als irgendeine Seitenkette, ist es für die Untersuchung der Strahleninaktivierung von Enzymen von großer Bedeutung, ob Peptidbindungen gegenüber Wasserradikalen reaktionsfähig sind.

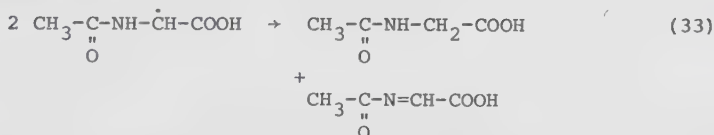
Ihr Verhalten während der Radiolyse wurde an zahlreichen Modellsubstanzen studiert. So untersuchte Garrison /29/ die Radiolyse von N-Acetylglycin und fand, daß die Primärreaktion der Entzug des H-Atoms vom C_α -Atom durch das OH'- oder H'-Radikal ist.



Das so gebildete Peptidradikal reagiert bevorzugt unter Dimerisierung, und man erhält Diacetyldiaminobernsteinsäure als Hauptprodukt:



Eine andere mögliche Reaktion des Peptidradikals ist die Disproportionierung:

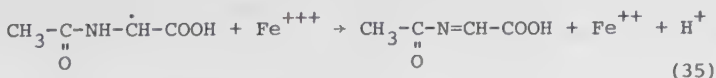


Das bei dieser Reaktion gebildete Dehydropeptid geht bei milder Hydrolyse in die entsprechende Ketosäure über:



In Gegenwart von Sauerstoff reagiert das Peptidradikal leicht unter Bildung eines Peroxyradikals, was dann auch zum Bruch der Peptidbindung führen soll.

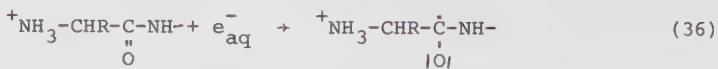
Da Schwermetallionen wie Fe^{+++} oder Cu^{++} Radikale organischer Moleküle leicht oxidieren, können sie auch bei der Radiolyse von Peptidbindungen eine Rolle spielen /30/:



In Gegenwart von Schwermetallionen können also die Peptidradikale bevorzugt zum Dehydropeptid oxidiert werden, die dann unter Spaltung der Peptidbindung zur Ketosäure reagieren. Auch in pulsradiolytischen Untersuchungen /31/ an Peptidbindungen verschiedener Modellsubstanzen fand man den von Garrison vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus bestätigt.

Der Entzug des H-Atoms vom C_α-Atom der Aminosäurereste ist die wichtigste Primärreaktion bei der Reaktion des OH[•] und H[•]-Radikals mit Peptiden und Proteinen. Es konnte gezeigt werden, daß der Amidstickstoff die N-Methylgruppe aktiviert, so daß die H-Atom-Abspaltung von ihr mindestens 10mal schneller verläuft als von anderen Methylgruppen. Die Gegenwart einer terminalen Aminogruppe beeinflusst sehr stark die Reaktivität und den Angriffspunkt der OH[•]-Radikale. Die Geschwindigkeitskonstanten hängen deshalb auch sehr stark vom Protonisierungszustand der Aminoendgruppe ab. Mit zunehmender Länge der Peptide und zunehmender Zahl der Seitenkette nimmt der Einfluß der Aminoendgruppe jedoch ab. Von Simic und Mitarbeitern wurde für die Reaktionen von Acetyl-glycin und Acetylalanin $k = 4,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, bzw. $4,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ gefunden. Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Peptidbindungen mit OH[•]-Radikalen ist daher sicher um eine Größenordnung kleiner als bei den aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren. Die Wahrscheinlichkeit der Reaktion sollte aber wegen der etwa 10fach höheren Konzentration an Peptidbindungen etwa gleich groß sein.

Für die Reaktionen der solvatisierten Elektronen nimmt Garrison /22/ folgende Primärreaktion an:



Durch anschließende Dissoziation oder Hydrolyse trifft Desaminierung ein. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion der Elektronen mit Peptidbindungen wurden von Braams /32/ gemessen. Er fand, daß in neutralen Lösungen die Reaktivität

der Dipeptide größer ist als die der entsprechenden Aminosäuren. So ist z.B. die Geschwindigkeitskonstante von Glycylglycin zehnmal höher als von Glycin. Da diese Reaktionen aber im alkalischen Gebiet viel langsamer werden, wurde angenommen, daß die protonisierte Aminogruppe die reagierende Gruppe ist und nicht die Peptidgruppe. Die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit vom Glycin zum Dipeptid ist bedingt durch die Änderung des pk-Wertes. Ist die Aminogruppe blockiert wie im Acetylglycin oder Acetylalanin - Moleküle, die auch eine Peptidgruppe enthalten - so verläuft die Reaktion nur noch mit $k = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Aus zahlreichen Messungen an Peptiden kann für die Reaktion der solvatisierten Elektronen mit der Peptidbindung auf eine Geschwindigkeitskonstante unterhalb von $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ geschlossen werden. Bei einer so niedrigen Geschwindigkeitskonstanten wird trotz der großen Anzahl von Peptidbindungen im Molekül beim Vorhandensein von Cystin oder Cystein ($k \approx 10^{10}$), die Reaktion der solvatisierten Elektronen mit den Peptidbindungen bei der Radiolyse von Proteinen keine Rolle spielen.

Auch neuere Untersuchungen von Simic und Hayon /32/ bestätigen, daß der Angriff von solvatisierten Elektronen an Peptidbindung erfolgt und daß dann bei kleinen Peptiden Desaminierung die Folge ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß mit Zunahme der Peptidbindung die Reaktivität ansteigt, so z.B. für N-Acetyl-trialanin auf $k = 6,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ von dem Wert für N-Acetylalanin $k = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Die Bestimmung der Anfangs- und Endlokalisation des Elektrons, die wichtig für das Verständnis der Strahleninaktivierung der Enzyme ist, konnte nur für die kleinen Peptide geklärt werden. Aus den Spektren der Übergangsprodukte der Pulsradiolyse kann angenommen werden, daß das Elektron an die C-Gruppe der Peptidbindung angelagert wird und dann zu der protonisierten Aminoendgruppe hin verschoben wird. In dieser Arbeit konnte aber nicht geklärt werden, ob dieser Mechanismus auch bei langkettigen Peptiden und Proteinen wirksam ist oder ob das Elektron an der -CO-Gruppe der Peptidbindung lokalisiert bleibt.

Nach den bis jetzt bekannten strahlenchemischen Reaktionen muß man annehmen, daß eine Reaktion der $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikalen mit den Peptidbindungen der Enzyme möglich ist. Hingegen kann zumindest für Enzyme, die Cystin oder Cystein enthalten, angenommen werden, daß die Radiolyse der Peptidbindungen durch solvatisierte Elektronen unbedeutend ist. Über die Einwirkung von H-Radikalen auf Peptidbindungen gibt es in der Literatur keine Angaben.

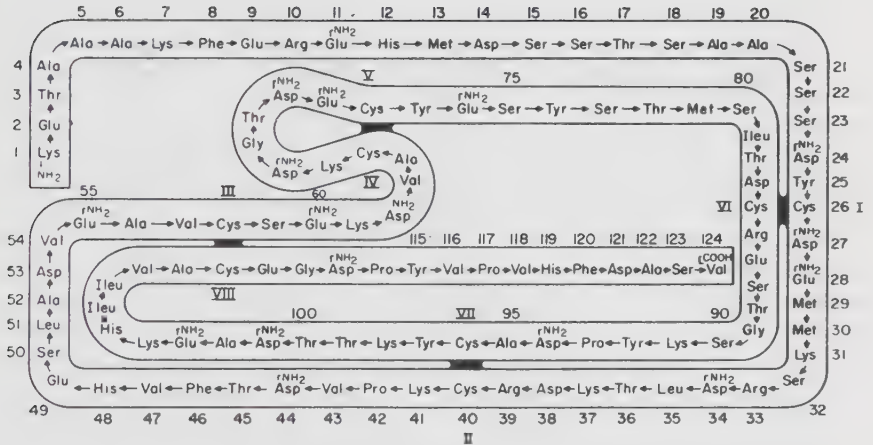
1.4 Problemstellung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, reagieren bei der Radiolyse $\text{OH}^{\bullet}$ - und $\text{H}^{\bullet}$ -Radikale sowie solvatisierte Elektronen mit dem gelösten Enzym. Es ist nun die Frage, ob Reaktionen aller Primärprodukte der Wasserradiolyse zur Inaktivierung des Enzyms beitragen. Die Kenntnis der strahlenchemischen Reaktionen ermöglicht zur Klärung dieser Frage den Einsatz von Substanzen, die bevorzugt mit einem der Primärradikale reagieren, so daß dieses von der Reaktion mit dem Protein ausgeschlossen ist. Falls die Reaktionen dieses Radikals zur Inaktivierung beitragen, kann man gegebenenfalls nach Bestrahlung in Gegenwart dieser Fängersubstanz eine geringere Inaktivierung bei gleicher Dosis beobachten. Eine wichtige Frage bei Verwendung solcher Fängersubstanzen ist, ob noch außer dem Abfangen der Wasserradikale Wechselwirkungen mit dem Protein auftreten, wodurch Strahlenschutz oder -sensibilisierung herbeigeführt wird.

Gleichzeitig soll es auch Aufgabe dieser Arbeit sein, die unter den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen durch bestimmte Wasserradikale bewirkten Änderungen am Molekül festzustellen und in Korrelation zur Inaktivierung zu setzen.

Diese Untersuchungen wurden an Ribonuclease durchgeführt, einem Enzym, dessen Aminosäuresequenz bereits seit 1960 bekannt ist /34/. Sie besteht aus 124 Aminosäuren, die eine Peptidkette

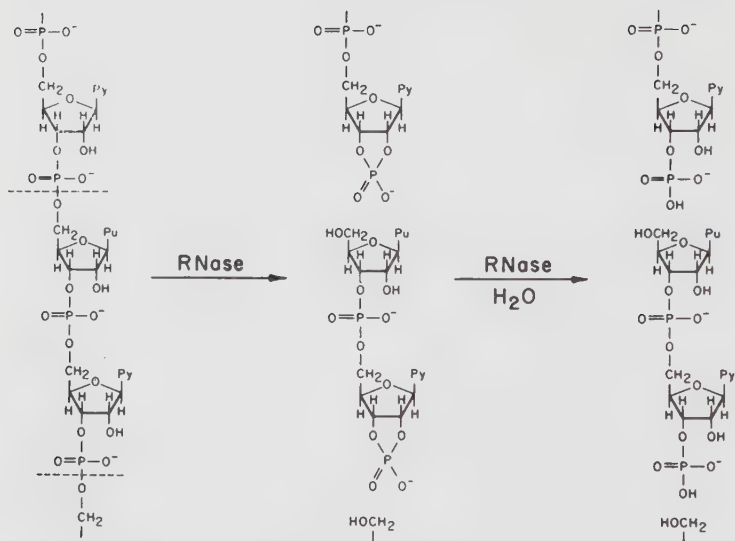
bilden. An 4 Stellen ist diese Kette durch Disulfidbrücken verknüpft.



Zahlreiche biochemische Arbeiten /35/ beschäftigen sich mit Struktur und Funktion der Ribonuclease A, so daß eine Vielzahl von Denaturierungsvorgängen bei diesem Enzym bekannt ist und zum Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit herangezogen werden kann.

Die Ribonuclease katalysiert zwei verschiedene Reaktionen beim Abbau der Ribonucleinsäuren:

1. Die Depolymerisierung, die durch eine Umesterung und unter Bildung eines cyclischen Phosphates erfolgt und
2. die Hydrolyse des cyclischen Phosphates



Im Rahmen dieser Arbeit war es auch von Interesse, ob beide katalytischen Funktionen dieselbe Strahlenempfindlichkeit bei den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen aufweisen oder ob bestimmte strahleninduzierte Veränderungen am Molekül nur zur Inaktivierung einer der Funktionen führen. Eine solche Untersuchung kann zur Klärung der Frage beitragen, ob die gleiche Molekülgruppierung zur Katalyse der Depolymerisierung und der Hydrolyse notwendig ist.

2. Methodischer Teil

2.1 Reinigung der Ribonuclease

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde nur chromatografisch gereinigte Ribonuclease A aus Rinderpancreas verwendet. Das von der Firma Sigma erhältliche fünfmal umkristallisierte Enzympräparat wurde über eine Ionenaustauschersäule von Amberlite IRP-64 (3x50 cm) mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,47 entsprechend der Vorschrift von Hirs u.a. /36/ aufgetrennt. Die dabei erhaltene Ribonuclease-A-Fraktion wurde, um sie vom Phosphat zu befreien, über Sephadex G-25 (3x40 cm) mit 0,05 M Ammoniumacetat gelfiltriert. Dann wurde durch dreimaliges Gefrier-trocknen das Ammoniumacetat aus dem Enzympräparat entfernt. Die so gewonnene Ribonuclease A wurde in einem chromatografischen Test auf Einheitlichkeit geprüft. Dazu wurden 10 mg Ribonuclease über Amberlite IRP-64 (1x30 cm) mit einem Gradienten von 3x35 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,4 und 1x35 ml 1,0 M Phosphatpuffer pH 6,47 aufgetrennt. Es wurden 3 ml Fraktionen aufgefangen, von denen der Proteingehalt und die enzymatische Aktivität der beiden Funktionen geprüft wurde. Nur Präparate, die sich in diesem Test als einheitlich erwiesen, wurden zu weiteren Untersuchungen eingesetzt.

2.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

2.2.1 Depolymerase Aktivität

Die Depolymerase-Aktivität der Ribonuclease wurde nach der Methode von Potts u.a. /37/ bestimmt. Dabei wird die Abnahme der Lichtstreuung bei 300 nm einer 0,1%-igen Ribonucleinsäurelösung in 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 bei 30°C gemessen. Dazu wurden jeweils 100 µl Enzymlösung mit einer Ribonucleasekonzentration von 10 - 100 µg/ml in 3,0 ml Substratlösung gegeben. Es wurde etwa 2 Minuten lang alle 10 Sekunden der Ex-

tinktionswert abgelesen. Aus diesen Werten wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Extinktionsabnahme als $\frac{\Delta E}{\text{sec}}$ ermittelt, die unter diesen Bedingungen bis zu einer Minute konstant war. Der Fehler dieser Bestimmung lag unter 4 %.

Im Laufe dieser Arbeit wurde für diese Bestimmung ein weitgehend automatisches Verfahren entwickelt. Dabei wurden die Meßwerte unter Verwendung eines Multilog-Instruments in digitaler Form ausgegeben und mit einem Teletype auf Lochstreifen übertragen. Aus diesen Meßdaten wurde von einem Rechner mit einem Fortran-Programm* für die lineare Regression der Wert für $\frac{\Delta E}{\text{sec}}$ berechnet. Durch die Automatisierung dieser Bestimmung war es möglich, die Anzahl und die Genauigkeit der Messungen zu steigern. Da alle 3 Sekunden ein Wert registriert wurde, konnten Konzentrationen bis zu 18 µg Ribonuclease / Testansatz bestimmt werden.

2.2.2 Hydrolase-Aktivität

Die Hydrolase-Aktivität wurde nach der Methode von Richards und Vithayathil /38/ gemessen. Als Substrat wurde eine 0,2-%ige Lösung von cyclischen Cytidinphosphat in 0,3 M Natriumchlorid pH 7,0 verwendet. Die Titration der freiwerdenden Säuregruppe erfolgte mit dem Autotitrator im pH-stat unter N₂ bei 30°C mit 0,002 M NaOH. Mit 2 ml Substratlösung konnte bis zu 10 µg Ribonuclease getestet werden. Als Maß für die Aktivität der Hydrolasefunktion wurde die zur Aufrechterhaltung des pH's verbrauchte Alkalimenge pro Minute gemessen. Der Fehler dieser Bestimmung war kleiner als 2 %.

* Herrn Dipl.-Ing. G. Oetken danke ich für die Durchführung der Berechnungen und das Schreiben des Programmes.

2.3 Bestrahlung

2.3.1 Bestrahlung der Ribonuclease

Die zu bestrahlende Lösung kam in ein mit Kühlmantel versehenes Quarzgefäß, das einen Durchmesser von 3,6 cm hatte und 3,0 cm hoch war. Das Quarzgefäß wurde mit einer 0,03 mm dicken Hostaphanfolie verschlossen. Es hatte eine Zuleitung für Gas und eine Öffnung zur Probeentnahme. Die Enzymlösung wurde beim Gasaustausch und während der Bestrahlung durch einen Magnetrührer und ein Teflonmagnetrührstäbchen gerührt. Um Rückstreuung von der Metallplatte des Magnetrührers in die Probe zu vermeiden, wurde zwischen Bestrahlungsgefäß und Magnetrührer ein 5 cm dicker Plexiglasblock gelegt. Die Temperatur der Lösung wurde mit einem Kryostaten auf 1,5°C konstant gehalten.

2.3.2 Gasbedingungen während der Bestrahlung

Zur Verdrängung des Sauerstoffs aus der Probe wurde Stickstoff über die Enzymlösung geleitet, die gleichzeitig gekühlt und gerührt wurde. Mit Hilfe des Gasmonitors der Firma Radiometer wurde gemessen, daß man unter diesen Bedingungen nach 60 Minuten einen Sauerstoffpartialdruck von 12 Torr erreicht, der auch bei weiterem Überleiten von Stickstoff konstant bleibt. Unterbleibt das Rühren, so erreicht man erst nach 120 Minuten einen Partialdruck von 22 Torr. Diesen gleichen Wert erhält man auch, wenn man Stickstoff unter Vermeiden von Schaumbildung durch die Probe leitet. Aus dem gemessenen Sauerstoffpartialdruck von 12 Torr errechnet sich eine Sauerstoffkonzentration von 3×10^{-5} M. Auch bei Verwendung von Argon an Stelle von Stickstoff erhielt man den gleichen Restgehalt an Sauerstoff. Bei pulsradiolytischen Arbeiten wurde durch das gleiche Verfahren der Sauerstoff verdrängt. In den so behandelten Pufferlösungen wurden für die Halbwertszeit des Elektrons stets Werte von 13-19 μsec gemessen. Wäre entsprechend unserem Meßergebnis mit dem Radiometergerät $3 \cdot 10^{-9}$ M Sauerstoff vorhanden, wäre die Halbwertszeit für das Elektron nur etwa 1 μsec gewesen. Selbst bei der Annahme, daß das Elektron nur mit dem restlichen Sauerstoff reagiert und nicht auch mit Verunreinigungen der Pufferlösungen, muß der Sauerstoffgehalt der Bestrahlungsproben unter $2 \cdot 10^{-6}$ M liegen. Damit keine Konzentrierung der Enzymprobe auf-

treten konnte, ließ man das Gas, bevor es über die Probe geleitet wurde, sich bei $1,5^{\circ}\text{C}$ mit Wasser sättigen. Bei Verwendung von N_2O ließ man das Gas durch eine alkalische Pyrogalllösung strömen, um den als Gasverunreinigung enthaltenen Sauerstoff zu entfernen. Die N_2O -Konzentration in gesättigter Lösung bei 1°C ist $0,05 \text{ M}$.

2.3.3 Dosisbestimmung

Die Bestrahlungen wurden ausgeführt mit einer Röntgentherapie-röhre Stabilipan von der Firma Siemens. Die Bestrahlungsbedingungen waren 200 kV Spannung bei 20 mA Röhrenstrom. Das Spektrum wurde ungefiltert verwendet, abgesehen von der Eigenfilterung der Röhre, die 2 mm Aluminium entsprach. Die Dosis wurde nach 2 Verfahren gemessen. Eine physikalische Dosisbestimmung* erfolgte mit Hilfe eines Kondimeters der Firma Pychlau und ergab eine Dosisleistung von 2700 R/Min. , was einer Energiedosisleistung von $2,51 \text{ krd/Min.}$ entspricht.

Für eine chemische Dosisbestimmung wurde die Fricke-Dosimetrie /39/ angewandt nach einem von Frankenberg /40/ veränderten Verfahren. Die Fricke-Dosimetrie beruht auf der Bestimmung von Fe^{+++} , das durch Oxidation von Fe^{++} durch OH-Radikale entstanden ist. In saurem Medium in Gegenwart von Sauerstoff ist der G-Wert für Fe^{+++} $15,5$. Bei der Durchführung dieser Messung wurden jeweils $10 \text{ ml } 10^{-3} \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, das in $5 \times 10^{-2} \text{ M } \text{H}_2\text{SO}_4$ gelöst war, bestrahlt. Die Lösung enthielt ferner noch 10^{-3} M NaCl und $3,5 \times 10^{-3} \text{ M Cs}_2\text{SO}_4$. Nach der Bestrahlung kann das entstandene Fe^{+++} entweder direkt photometrisch bei 304 nm mit einem Extinktionskoeffizient für Fe^{+++} von $2201 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ausgemessen werden oder als $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ bei 436 nm bestimmt werden. Für die letztere Bestimmung, die etwa 4mal empfindlicher ist als die direkte spektrometrische Bestimmung, wird zu 3 ml der bestrahlten Lösung 1 ml einer Lösung von NH_4SCN in einer Konzentration von $0,75 \text{ g/ml}$ gegeben. Die Menge gebildeten Fe^{+++}

* Für die Durchführung dieser Messung danke ich Herrn Dr. Th. Schmidt, Herrn Dr. K. Kunigk und Herrn Dr. P. Milbers. Diese Messung ist ausführlich beschrieben in der Doktorarbeit Kunigk.

wurde jeweils nach 10 verschiedenen Bestrahlungszeiten zwischen 20 und 140 Sekunden gemessen. Es wurde eine Energiedosisleistung von 2,49 krd/Min. gefunden.

2.4 Dosis-Effekt-Kurven

Für die Dosis-Effekt-Kurven wurden in zeitlich gleichmäßigen Abständen 150 μ l Proben durch einen seitlichen Ansatz des Bestrahlungsgefäßes entnommen. Die Proben wurden für die Enzymbestimmung so verdünnt, daß 100 μ l der verdünnten Enzymlösung etwa 10 μ g Ribonuclease enthielten. Aus den erhaltenen Werten für die enzymatischen Aktivitäten wurde in Abhängigkeit von der Dosis eine exponentielle Kurve der Form $y = a \cdot e^{-bx}$ unter Benutzung einer linearen Regressionsmethode die Dosis-Effekt-Kurve ermittelt.

Dabei sind: y = enzymatische Aktivität in %
 x = Bestrahlungszeit in Minuten
 a = die Aktivität des nativen Enzyms
in %
 b = Inaktivierungsgeschwindigkeit als
$$\frac{\Delta \text{Aktivität (\%)}}{\text{Bestr.zeit (Min)}}$$

Den Wert für die D_{37} erhält man aus dem reziproken Wert der Inaktivierungsgeschwindigkeit (s.S.4) multipliziert mit der gemessenen Dosisleistung. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe eines Hewlett-Packard-Tischrechners 9100 A.

2.5 Gelfiltration

Bei der Vorbereitung der Sephadex-Gele und -säulen wurde im wesentlichen nach den Vorschriften der Hersteller gearbeitet.

Um bei der Gelfiltration kleiner Proteinmengen zu eindeutigen Resultaten zu kommen, muß darauf geachtet werden, daß Puffer, Gele und alle verwendeten Gegenstände (Schläuche, Säulen, Gläser, usw.) möglichst keimfrei sind. Deshalb wurden alle Pufferlösungen und Gele im Autoklaven bei 120°C 20 Minuten lang sterilisiert und alle Gegenstände mit Maranon, einem Desinfektionsmittel der Fa. Henkel oder mit 70-%igem Propanol behandelt. Weiterhin wurde der Chromatographieraum mit UV-Licht ausgeleuchtet und Säulen und Eluat auf 4°C gekühlt. Zur Prüfung auf Keimfreiheit wurden jeweils 0,1 ml der Lösungen auf Agarplatten aufgetragen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Um in Arbeitspausen den Wuchs von Mikroorganismen auf den Säulen zu verhindern, wurden sie dann mit einem Zusatz von 0,002 % Chlorhexidin-Acetat (Hibitan der Firma ICI) im Puffer versetzt.

Bei Trennungen des Enzyms wurde das Eluat in 2,2 ml Fraktionen aufgefangen, deren Proteingehalt durch Messung der Extinktion bei 278 nm in 1 cm-Quarz-Küvetten bestimmt wurde.

2.6 Aminosäureanalyse

Proteinfraktionen, deren Aminosäurezusammensetzung bestimmt werden sollte, wurden durch Gelfiltration über Sephadex G-25 von ihren Salzen befreit und in Ammoniumacetat überführt, das dann durch Gefrier Trocknen entfernt werden konnte. Die so erhaltenen Proteinfraktionen wurden in 6 n Salzsäure und in bei $4 \cdot 10^{-2}$ Torr abgeschmolzenen Glasampullen 22 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Danach wurde der größte Teil der Salzsäure durch dreimaliges Eindampfen im Vakuum im Rotationsverdampfer entfernt. Das Hydrolysat wurde in einem Citratpuffer vom pH 2,2 aufgenommen. Die Aminosäureanalyse erfolgte nach der Methode von Spackman, Stein und Moore /41/ mit Hilfe eines automatischen Aminosäureanalysators der Fa. Biocal (München). Bei der Berechnung der Analysen nahm man Valin aufgrund der pulsradiolytischen Daten und früherer Versuche als strahlenresistent an.

2.7 Bestrahlungsversuche unter Verwendung von ^{14}C -markiertem Aethanol

Zu 6,0 mg Ribonuclease, die in 6 ml 0,003 M PO_4 - Puffer pH 7,0 gelöst waren, wurden 36 μl Aethanol hinzupipettiert. Dieses Aethanol enthielt im Verhältnis von 0,7: 100 $\text{CH}_3^{14}\text{CH}_2\text{OH}$. 0,5 ml der Enzymlösung wurde als Kontrollprobe aufgehoben. Durch 5,5 ml dieser Lösung ließ man 30 Minuten lang unter Eiskühlung N_2O hindurchströmen. Danach wurde das Gefäß dicht verschlossen. Der Verlust an Aethanol bedingt durch den Gasstrom war dabei stets kleiner als 10 %. Die Bestrahlung erfolgte in einer $\text{Co-}\gamma$ -Quelle unter Eiskühlung. 5,0 ml dieser bestrahlten Lösung wurden über eine Säule von G-75 superfine (1,2 x 120 cm) chromatographiert und in 2,0 ml Fraktionen aufgefangen. Zur Messung des ^{14}C -Gehalts wurden von jeder Fraktion 0,5 ml mit 10 ml Aquasol vermischt und dann im Flüssigkeitszintillationszähler 10 Minuten lang gezählt.

3. Ergebnisse

3.1 Kompetierende Radikalreaktionen

Wie bereits unter 1.4 ausgeführt wurde, soll in dieser Arbeit untersucht werden, welche Primärradikale der Wasserradiolyse mit Ribonuclease reagieren und welche Reaktionen zur Inaktivierung der Depolymerase- oder Hydrolasefunktion führen. Zur Untersuchung dieser Frage werden bei der Bestrahlung der Enzymlösung Substanzen zugesetzt, die entweder bevorzugt mit den $\text{OH}^\cdot$ -Radikalen oder mit den solvatisierten Elektronen reagieren. Durch den Zusatz solcher Substanzen läßt sich dann entsprechend die Reaktion der $\text{OH}^\cdot$ -, der $\text{H}^\cdot$ -Radikale bzw. der solvatisierten Elektronen mit dem Enzym unterbinden. Aus der Größe der auftretenden Schutzwirkung kann man dann feststellen, in welchem Umfang die verschiedenen Radikale zur Inaktivierung beitragen. Bei der Radiolyse kann das Radikal eines bestimmten Typs (X_j) nun sowohl mit der Ribonuclease als auch mit der zugesetzten Substanz (P) reagieren. Die Geschwindigkeit der Abnahme einer Substanz hängt dabei ab von ihrer Geschwindigkeitskonstante und der Konzentration des reagierenden Primärradikals. Die native Ribonuclease nimmt danach nach folgender Gleichung ab:

$$-\frac{d(\text{RNase})}{dt} = k_{\text{RNase} + \text{X}_j} \cdot (\text{RNase}) \cdot (\text{X}_j) \quad (37)$$

und die zugesetzte Substanz (P) nimmt entsprechend ab nach:

$$-\frac{d(\text{P})}{dt} = k_{\text{P} + \text{X}_j} \cdot (\text{P}) \cdot (\text{X}_j) \quad (38)$$

Die Wahrscheinlichkeit $W_{\text{Ribonuclease} + \text{X}_j}$ für die Reaktion von Ribonuclease mit dem Radikal X_j ist dann gleich der Geschwindigkeit der Reaktion (37) dividiert durch die Summe beider Reaktionen, nach denen die Konzentration von $\text{X}_j^\cdot$ abnimmt /42/.

$$W_{\text{RNase} + \text{X}_j} = \frac{k_{\text{RNase} + \text{X}_j} \cdot (\text{RNase})}{k_{\text{RNase} + \text{X}_j} \cdot (\text{RNase}) + k_{\text{P} + \text{X}_j} \cdot (\text{P})} \quad (39)$$

$W_{\text{Ribonuclease}} + X_j \cdot$ ist also unabhängig von der Konzentration der reagierenden Primärradikale. Die bei diesen Berechnungen benutzten Geschwindigkeitskonstanten sind im Anhang in einer Tabelle zusammengefaßt.

Die Reaktion des Primärradikals mit dem nativen Enzym muß nicht unbedingt zu seiner Inaktivierung führen. Sie kann auch ein modifiziertes Enzym ergeben, dessen biologische Aktivität unverändert oder nur teilweise verloren gegangen ist.

3.2 Die Wirkung des Abfangens von solvatisierten Elektronen auf die Strahleninaktivierung der Ribonuclease

3.2.1 Strahleninaktivierung von Ribonuclease unter N_2 und unter N_2O

Will man die Inaktivierung, die durch alle Primärradikale ausgelöst wird, untersuchen, dann muß man die Bestrahlung der Ribonuclease-Lösung unter Stickstoff ausführen. In Gegenwart von Luft reagieren die hydratisierten Elektronen sehr schnell mit Sauerstoff (s. Gleichung 17) unter Bildung von Peroxyradikalen, die durch ihre Reaktionen mit dem Protein ebenfalls zur Inaktivierung beitragen können.

Die Ribonuclease hat im Abbau der Ribonucleinsäure zwei verschiedene Aufgaben:

1. Die Katalyse der Umesterung, die die Depolymerisierung der RNS zur Folge hat und
2. die Katalyse der Hydrolyse des gebildeten cyclischen Phosphates (s.a. S.24)

Bei der Bestrahlung von Ribonuclease in einer Konzentration von $1 \text{ mg/ml} = 7,31 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ unter N_2 findet man für beide Funktionen gleiche Strahlenempfindlichkeit (s. Abb. 1 und 2). In

beiden Fällen zeigt sich für die Inaktivierung eine exponentielle Abhängigkeit von der Dosis entsprechend Gleichung 1. Der D_{37} -Wert für die Inaktivierung beider Funktionen ist 180 krd.

Sollen die Reaktionen der hydratisierten Elektronen mit der Ribonuclease verhindert werden, so muß die Radiolyse des Enzyms unter N_2O erfolgen. Die hydratisierten Elektronen reagieren mit N_2O nach folgender Gleichung:



mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $8,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. N_2O wird als Elektronenfänger anderen Substanzen vorgezogen, da man bei dem Reaktionsprodukt N_2 keine Weiterreaktion befürchten muß. Bei unseren Versuchsbedingungen werden die entstehenden OH^- -Ionen vom Puffer abgefangen, so daß der pH-Wert sich nicht verschiebt. Da durch die Reaktion mit N_2O die solvatisierten Elektronen in $OH^\cdot$ -Radikale umgewandelt werden, kann man damit rechnen, daß die Reaktionen der $OH^\cdot$ -Radikale verstärkt auftreten. Bei den Bestrahlungsversuchen wurden die Enzymlösungen bei $1,5^\circ\text{C}$ mit N_2O gesättigt. Die N_2O -Konzentration beträgt bei den beschriebenen Versuchsbedingungen $5 \times 10^{-2} \text{ M}$. Bei den in Abb. 1 und 2 dargestellten Dosis-Effekt-Kurven war die Ribonuclease-Konzentration bei der Strahleninaktivierung $1 \text{ mg/ml} = 7,31 \times 10^{-5} \text{ M}$ gewesen. Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Elektronen mit Ribonuclease wurde pulsradiolytisch von Lichtin /43/ bei pH 7,0 mit $1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Nach der Gleichung für kompetetierende Reaktionen /39/ läßt sich berechnen, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, daß unter diesen Bedingungen Elektronen mit Ribonuclease reagieren:

$$\begin{aligned} W_{RNase + e_{aq}^-} &= \frac{k_{RNase} + e_{aq}^- \cdot (RNase)}{k_{RNase} + e_{aq}^- \cdot (RNase) + k_{N_2O + e_{aq}^-} \cdot (N_2O)} \\ &= \frac{1,0 \cdot 10^{10} \cdot 7,31 \cdot 10^{-5}}{1,0 \cdot 10^{10} \cdot 7,31 \cdot 10^{-5} + 8,7 \cdot 10^9 \cdot 5 \cdot 10^{-2}} \\ &= \frac{7,31 \cdot 10^5}{7,31 \cdot 10^5 + 4,35 \cdot 10^8} = 1,7 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

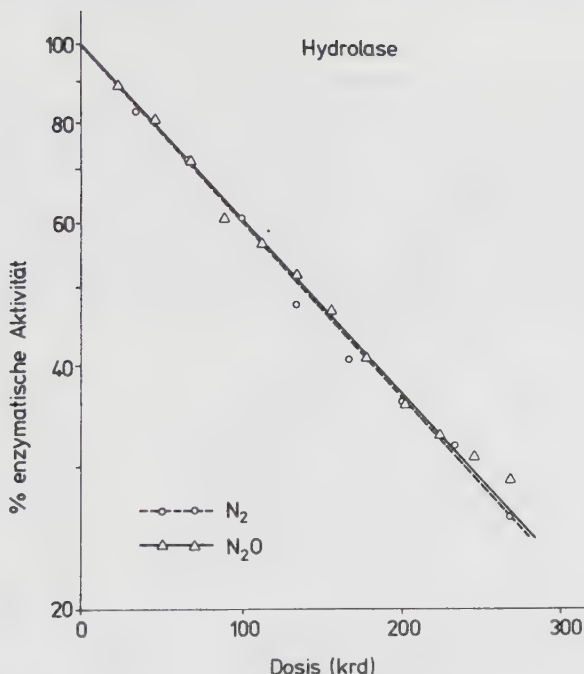


Abb. 1: Abhängigkeit der Aktivität der Hydrolasefunktion von der Dosis bei einer Ribonuclease-Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,00 bei N_2 - und N_2O -Sättigung.

Über 99 % der Elektronen werden also durch die Reaktion mit dem N_2O der Reaktion mit der Ribonuclease entzogen. In Abb. 1 und 2 sind die nach Bestrahlung unter N_2 und unter N_2O gemessenen Dosis-Effekt-Kurven für die beiden Funktionen der Ribonuclease wiedergegeben. Unter N_2 können bei der Radiolyse Reaktionen mit $OH^{\cdot-}$, $H^{\cdot-}$ -Radikalen und mit solvatisierten Elektronen erfolgen. Das Abfangen der Elektronen hat auf die Inaktivierung der Hydrolase-Funktion keinen Effekt, so daß man aufgrund dieser Messung zunächst annehmen könnte, daß die Reaktio-

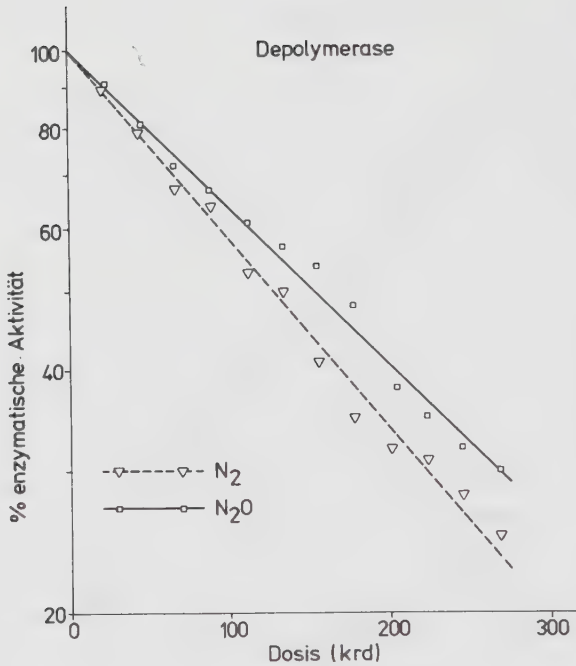


Abb. 2: Abhängigkeit der Aktivität der Depolymerasefunktion von der Dosis bei einer Ribonuclease-Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,00 bei N_2 - und N_2O -Sättigung.

nen der solvatisierten Elektronen durch die vermehrten Reaktionen der $OH^\bullet$ -Radikale kompensiert werden. Bei der Strahleninaktivierung der Depolymerase bewirkt das Abfangen der Elektronen jedoch einen Strahlenschutz. Hier zeigt sich bereits, daß die beiden Funktionen des Enzyms unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit haben können.

3.2.2 Die Abhängigkeit der D_{37} von der Enzymkonzentration unter N_2 und unter N_2O

Da die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bei der Strahleninaktivierung unter N_2O sehr widersprüchlich sind, wurde untersucht, ob auch bei anderen Enzymkonzentrationen der gleiche Effekt durch das Abfangen der Elektronen hervorgerufen wird. Es wurden daher die Dosis-Effekt-Kurven bei verschiedenen Ribonuclease-Konzentrationen für beide Funktionen gemessen unter N_2 und unter N_2O . Die daraus erhaltenen D_{37} -Werte wurden über der Enzymkonzentration aufgetragen (Abb. 3 und 4).

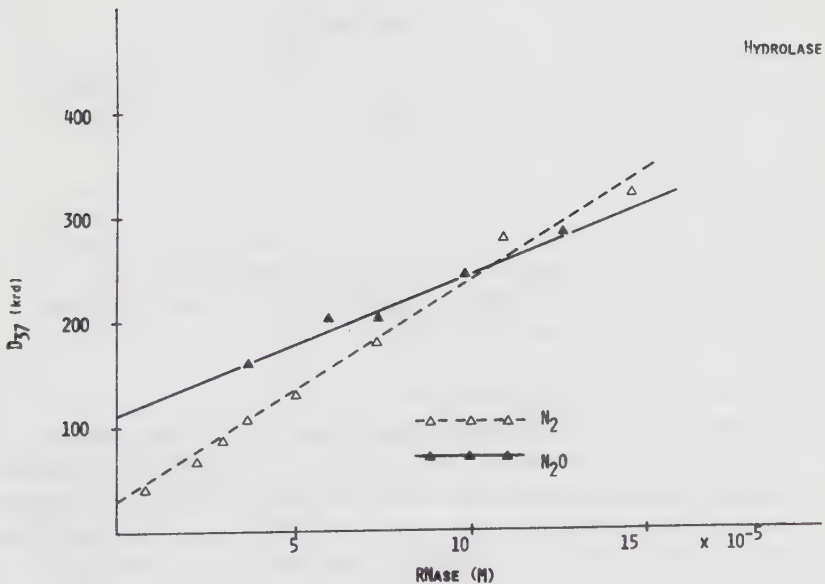


Abb. 3: D_{37} -Werte für die Hydrolasefunktion gemessen in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,00 bei N_2 - und N_2O -Sättigung in Abhängigkeit von der Ribonuclease-Konzentration.

DEPOLYMERASE

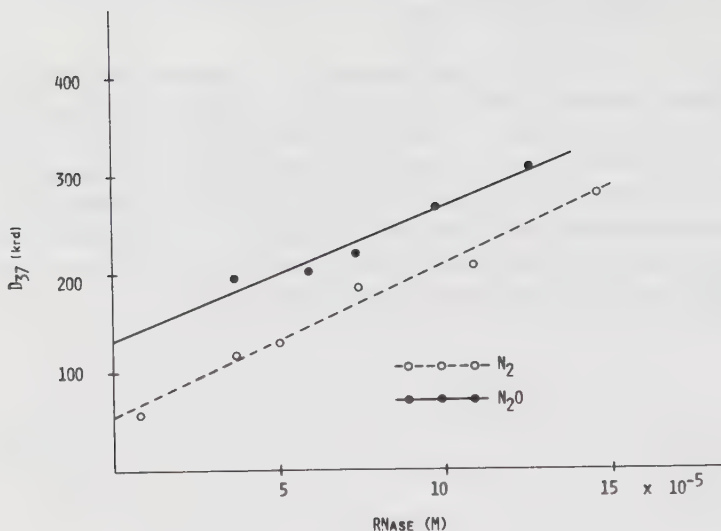


Abb. 4: D_{37} -Werte für die Depolymerasefunktion gemessen nach Bestrahlung in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,00 bei N_2 - und N_2O -Sättigung in Abhängigkeit von der Ribonuclease-Konzentration.

Für die Inaktivierung der Hydrolase-Funktion zeigte sich, daß der Effekt des Abfangens der Elektronen sehr stark von der Enzymkonzentration abhängt. Bei niedrigen Enzymkonzentrationen bewirkt das N_2O einen Strahlenschutz, der aber mit zunehmender Ribonuclease-Konzentration immer schwächer wird. Oberhalb einer Konzentration von 10^{-4} M Ribonuclease ist die Strahlenempfindlichkeit unter N_2O größer als unter N_2 .

Ein solches Phänomen wurde bereits von Dale (1949) /44/ bei der Messung von Strahlenschutzeffekten verschiedener Stoffe beobachtet und "changing quotient phenomen" benannt. Um den Schutzeffekt einer Substanz quantitativ abschätzen zu können, war von Dale ein Schutzquotient (protection quotient) R eingeführt worden, der das Verhältnis der Anteile von der Dosis wie-

dergibt, die vom Enzym und von der zugefügten Substanz verbraucht werden. Danach ist:

$$R = \frac{D_{37}^P - D_{37}}{D_{37}} \cdot \frac{(E_0)}{(P)} \quad (40)$$

wobei D_{37}^P = D_{37} gemessen in Gegenwart einer Schutzsubstanz P

(E_0) = Anfangskonzentration des Enzyms in M

(P) = Konzentration der Schutzsubstanz in M
ist.

Ribonuclease $\times 10^5$ (M)	D_{37}^P (krd)	D_{37} (krd)	$Q = \frac{D_{37}^P - D_{37}}{D_{37}} \cdot \frac{E_0}{P}$
<u>in Gegenwart von 5×10^{-2} M N_2O</u>			
3,65	161	108	$3,6 \cdot 10^{-4}$
5,84	203	160	$3,1 \cdot 10^{-4}$
7,31	201	190	$0,8 \cdot 10^{-4}$
9,50	245	235	$0,8 \cdot 10^{-6}$
12,60	286	300	$-1,2 \cdot 10^{-4}$
<u>in Gegenwart von 10^{-2} M Aethanol</u>			
2,19	170	78	$2,6 \cdot 10^{-3}$
3,65	220	108	$3,8 \cdot 10^{-3}$
5,18	250	150	$3,5 \cdot 10^{-3}$
7,31	293	190	$4,0 \cdot 10^{-3}$
11,11	341	270	$2,9 \cdot 10^{-3}$
12,60	421	300	$5,1 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 1: Schutzquotient Q nach Dale in Abhängigkeit von der Ribonuclease-Konzentration.

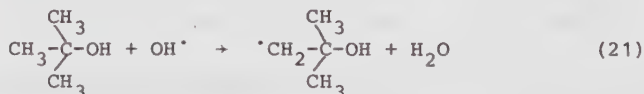
In Tabelle 1 sind die nach Gleichung (40) berechneten Schutzquotienten aus den gemessenen D_{37} -Werten zusammengestellt. Verglichen mit anderen Fängersubstanzen ist selbst bei niedrigen Ribonuclease-Konzentrationen die Schutzwirkung des N_2O recht gering.

Bei der Inaktivierung der Depolymerase-Funktionen wirkt sich das Abfangen der solvatisierten Elektronen im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich als Erniedrigung der Strahlenempfindlichkeit aus (Abb. 4). Die Steigungen der beiden Geraden, die man bei einer Auftragung der D_{37} -Werte für die beiden Funktionen in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bekommt, sind gleich.

3.3 Die Wirkung des Abfangens von $OH^\bullet$ -Radikalen auf die Strahleninaktivierung der Ribonuclease

3.3.1 Die Wahl der Fängersubstanz

Zum Abfangen von $OH^\bullet$ -Radikalen wird häufig t-Butanol verwendet, das nach folgender Gleichung reagiert:



Die Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion bei pH 7,0 ist $2,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mit $H^\bullet$ -Radikalen reagiert t-Butanol nur mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Auch durch Aethanol kann man $OH^\bullet$ -Radikale abfangen und zwar aufgrund folgender Reaktion:



Die Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion ist $1,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Sie ist also größer als diejenige für die entsprechende Reaktion mit t-Butanol. Aethanol reagiert auch mit $H^\bullet$ -Radikalen nach:



allerdings nur mit einer Geschwindigkeitskonstante von $1,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Reaktionen des Aethanols mit e_{aq}^- können nicht beobachtet werden.

Führt man die Radiolyse von Ribonuclease in einer Konzentration von 1 mg/ml in Gegenwart von 10^{-2} M Aethanol durch, so werden aufgrund der Gleichung (39) für kompetierende Radikalreaktionen 86 % der OH-Radikale der Reaktion mit der Ribonuclease entzogen:

$$\begin{aligned} W_{\text{RNase} + \text{OH}^\bullet} &= \frac{k_{\text{RNase}} + \text{OH}^\bullet \cdot (\text{RNase})}{k_{\text{RNase} + \text{OH}^\bullet} (\text{RNase}) + k_{\text{Aethanol} + \text{OH}^\bullet} (\text{Aethanol})} \\ &= \frac{2,4 \cdot 10^{10} \cdot 7,31 \cdot 10^{-5}}{2,4 \cdot 10^{10} \cdot 7,31 \cdot 10^{-5} + 1,1 \cdot 10^9 \cdot 10^{-2}} \\ &= 0,14 \end{aligned}$$

Um den gleichen Prozentsatz $\text{OH}^\bullet$ -Radikale durch t-Butanol abzufangen, müßte die Enzymlösung bei der Bestrahlung 0,03 M t-Butanol enthalten.

Durch den Zusatz von Alkoholen zu Proteinlösungen kann der hydrophobe Bindungsanteil im Proteinmolekül verringert werden, da sich hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Gruppen des Proteins und dem Alkohol ausbilden. Dadurch wird die Struktur des Proteins geschwächt und der zur Denaturierung notwendige Energieaufwand verringert sich, so wird z.B. bei der thermischen Denaturierung die Übergangstemperatur erniedrigt. Die Wirkung von Alkoholen auf die thermische Denaturierung der Ribonuclease wurde von Schrier, Ingwall und Scheraga /45/ untersucht. Dabei ergab sich, daß die Erniedrigung der Übergangstemperatur mit der Anzahl der C-Atome zunimmt. In der Reihe Methanol, Aethanol, iso-Propanol und t-Butanol nimmt die Übergangstemperatur linear mit der Anzahl der C-Atome ab. In der

Reihe der unverzweigten Alkohole ist die Abnahme noch stärker. Obgleich die in den Bestrahlungsversuchen angewandten Konzentrationen der Alkohole klein sind - allerdings benötigt man beim t-Butanol 3mal höhere Konzentration als beim Aethanol -, muß man auch hier bereits mit einer Veränderung der Proteinstruktur und der Strahleninaktivierung rechnen. Da man aber annehmen kann, daß diese Störungen bei 0,01 M Aethanol geringer sind als bei 0,03 M t-Butanol sind, wurde Aethanol als Fängersubstanz für $\text{OH}^{\cdot}$ -Radikale gewählt.

Eine andere Störung der Strahleninaktivierung durch die Fängersubstanz besteht darin, daß die durch die Radiolyse veränderten, aber noch aktiven Enzymmoleküle durch die Einwirkung von Alkoholen in ihrer innermolekularen hydrophoben Wechselwirkung gestört werden. Diese zusätzliche Störung kann dann zur Inaktivierung des modifizierten Enzyms führen. Eine derartige zusätzliche Inaktivierung durch die Fängersubstanz müßte man feststellen können, wenn man das Enzym in Phosphatpuffer ohne Fängersubstanz bestrahlt und anschließend die bestrahlten Enzymlösungen mit 10^{-2} M Aethanol inkubiert. Wirkt Aethanol auf das durch Strahlung modifizierte Enzym inaktivierend, dann müßte die nach der Bestrahlung vorhandene Restaktivität noch weiter absinken. In Abb. 5 ist das Ergebnis des entsprechenden Versuchs dargestellt. Es zeigte sich, daß Aethanol keine weitere Inaktivierung des bestrahlten Enzyms hervorruft. Die Dosis-Effekt-Kurve wird durch die Gegenwart von Aethanol nicht verändert. Obgleich die Störungen der Proteinmolekülstruktur durch Aethanol sicher geringer sind als durch t-Butanol, muß bei der Interpretation der Resultate bedacht werden, daß möglicherweise die durch Reaktion mit $\text{OH}^{\cdot}$ - oder $\text{H}^{\cdot}$ -Radikale gebildeten Aethanolradikale auch wieder weiter mit Ribonuclease reagieren können. Man nimmt zwar an, daß t-Butanol-Radikale reaktionsträger sind als Aethanol-Radikale, aber es konnte bis jetzt auch noch nicht bewiesen werden, daß diese Radikale nicht mit Proteinen reagieren.

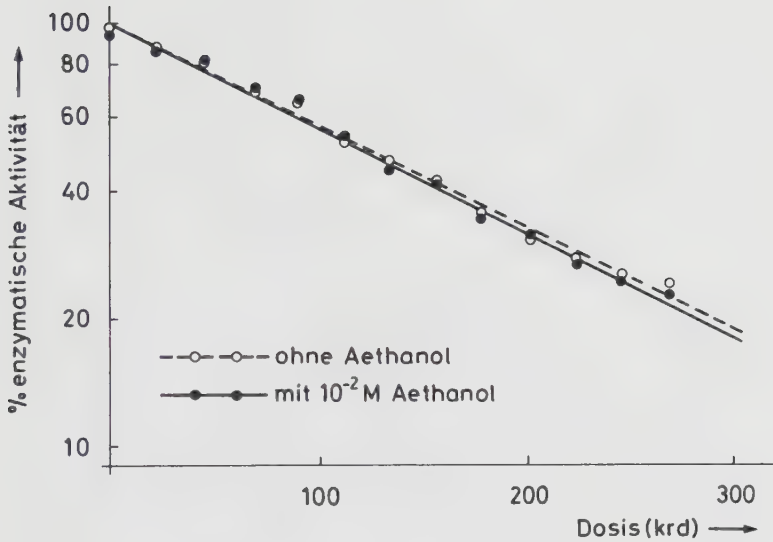


Abb. 5: Dosis-Effekt-Kurve nach Bestrahlen in 0,01 M
Phosphatpuffer pH 7,00
ohne Inkubieren mit Aethanol
nach Inkubieren mit Aethanol

3.3.2 Strahleninaktivierung von Ribonuclease in Gegenwart von 10^{-2} M Aethanol

In Abb. 6 und 7 sind die Dosis-Effekt-Kurven dargestellt, die man erhält, wenn man Ribonuclease in einer Konzentration von 1 mg/ml in Gegenwart von 10^{-2} M Aethanol bestrahlt. Im Vergleich dazu sind die Dosis-Effekt-Kurven aufgetragen, die man ohne Fängersubstanz aber unter sonst gleichen Bedingungen erhält. Durch das Abfangen von 86 % der vorhandenen OH'-Radikale wird ein Strahlenschutz für Hydrolase- und Depolymerasefunktion erzielt.

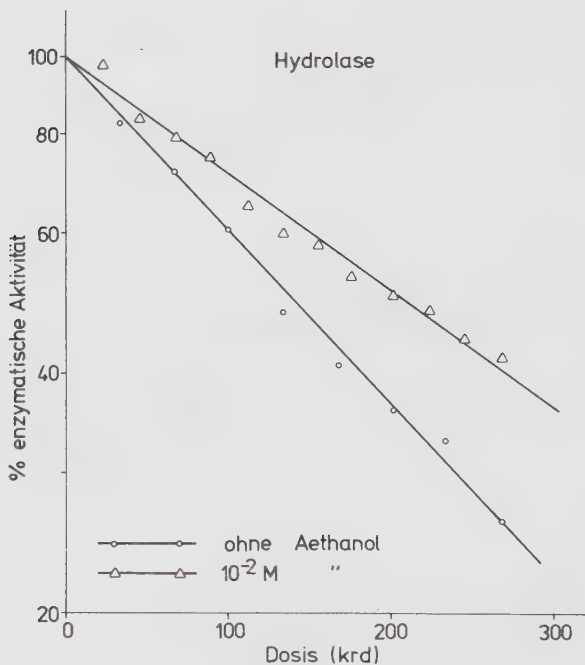


Abb. 6: Abhängigkeit der Aktivität der Hydrolasefunktion von der Dosis bei einer Ribonuclease-Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,00 mit und ohne Zusatz von Aethanol und N₂-Sättigung.

Bei der Hydrolase erhöht sich die D₃₇ von 192 auf 293 krd und bei der Depolymerase-Funktion sogar von 183 auf 378 krd. Bei den Bestrahlungsversuchen in Gegenwart von 10⁻² M Aethanol konnten bei den Dosis-Effekt-Kurven keine Abweichungen von der exponentiellen Form festgestellt werden.

Dosis-Effekt-Kurven für die beiden Funktionen der Ribonuclease wurden für unterschiedliche Enzymkonzentrationen aufge-

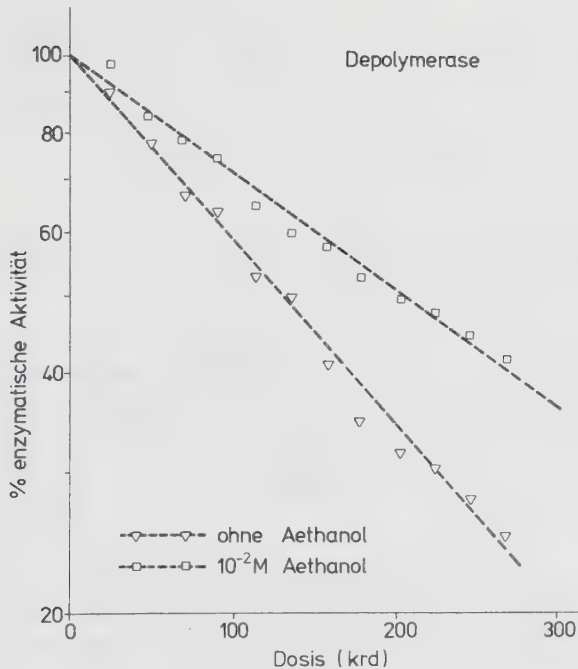


Abb. 7: Abhängigkeit der Aktivität der Depolymerasefunktion von Dosis bei einer Ribonuclease-Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,00 mit und ohne Zusatz von Aethanol und N₂-Sättigung.

nommen und die erhaltenen Werte für die D₃₇ in Abhängigkeit von der Ribonuclease-Konzentration aufgetragen (Abb. 8). Zum Vergleich sind auch die D₃₇-Werte, die man bei Bestrahlung unter gleichen Bedingungen aber ohne Zusatz von Alkohol erhält, wiedergegeben. Für die Hydrolase-Funktion findet man, daß das Abfangen der OH[•]-Radikale einen gleichbleibenden Schutz über den gemessenen Konzentrationsbereich ergibt. Der von Dale eingeführte Schutzquotient ist also konstant (s. Tabelle 1). Bei

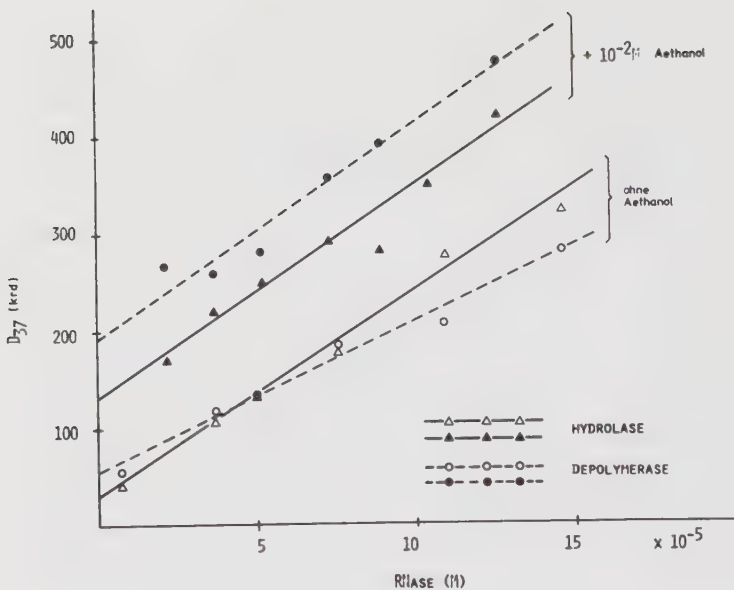


Abb. 8: D_{37} -Werte für die Hydrolase- und Depolymerasefunktion gemessen nach Bestrahlung der Ribonuclease in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,00 mit und ohne Zusatz von Aethanol und N_2 -Sättigung in Abhängigkeit von der Ribonuclease-Konzentration.

der Auftragung der D_{37}^P und der D_{37} für die Hydrolase-Funktion über die Ribonuclease-Konzentration erhält man 2 Parallelen, die im Abstand von 100 krd die y-Achse schneiden. Parallel dazu verläuft auch die Gerade, die man aus den D_{37}^P -Werten für die Inaktivierung der Depolymerase-Funktion bei Bestrahlung in Gegenwart von $10^{-2} M$ Aethanol erhält. Der Schnittpunkt mit der y-Achse liegt noch etwa 70 krd höher als derjenige für die Hydrolasefunktion.

Eine andere Steigung als die besprochenen Gerade hat hingegen die Gerade, die man für die D_{37} -Werte für die Inaktivierung der Depolymerase-Funktion unter N_2 findet.

Die bei der Bestrahlung unter N_2 in Gegenwart von 10^{-2} M Aethanol gefundene Inaktivierung der beiden Enzymfunktionen muß bedingt sein durch Reaktionen der Ribonuclease mit solvatisierten Elektronen, mit H-Radikalen, mit den noch nicht abgefangenen OH-Radikalen und eventuell auch durch die entstandenen Aethanolradikale.

3.4 Die Wirkung des Abfangens von H'-Radikalen auf die Strahleninaktivierung der Ribonuclease

Da Aethanol auch mit den H'-Radikalen reagiert (s. S. 40), hat man die Möglichkeit durch Erhöhung der Aethanolkonzentration zusätzlich zu den OH'-Radikalen auch H'-Radikale abzufangen. Bei einer Enzymkonzentration von 1 mg/ml und einer Aethanolkonzentration von 10^{-1} M gelingt es mehr als die Hälfte der vorhandenen H'-Radikale abzufangen wie sich nach Gleichung (39) berechnen läßt:

$$\begin{aligned} w_{RNase + H^{\bullet}} &= \frac{k_{RNase + H^{\bullet}} (RNase)}{k_{RNase + H^{\bullet}} (RNase) + k_{Aethanol + H^{\bullet}} (Aethanol)} \\ &= \frac{1,5 \cdot 10^{10} \cdot 7,31 \cdot 10^{-5}}{1,5 \cdot 10^{10} \cdot 7,31 \cdot 10^{-5} + 1,6 \cdot 10^7 \cdot 10^{-1}} \\ &= \frac{1,10 \cdot 10^6}{1,10 \cdot 10^6 + 1,6 \cdot 10^6} \\ &= 0,41 \end{aligned}$$

Unter den gleichen Bedingungen werden über 98 % der vorhandenen OH'-Radikale durch Reaktion mit dem Aethanol abgefangen.

In Abb. 9 und 10 sind die nach Bestrahlung unter N_2 in Gegenwart von 10^{-2} und 10^{-1} M Aethanol gefundenen D_{37} für die beiden Funktionen bei verschiedenen Ribonuclease-Konzentrationen wiedergegeben. Sowohl bei der Hydrolase- als auch bei der Depolymerase-Funktion findet man bei 10^{-1} M Aethanol niedrigere D_{37} -

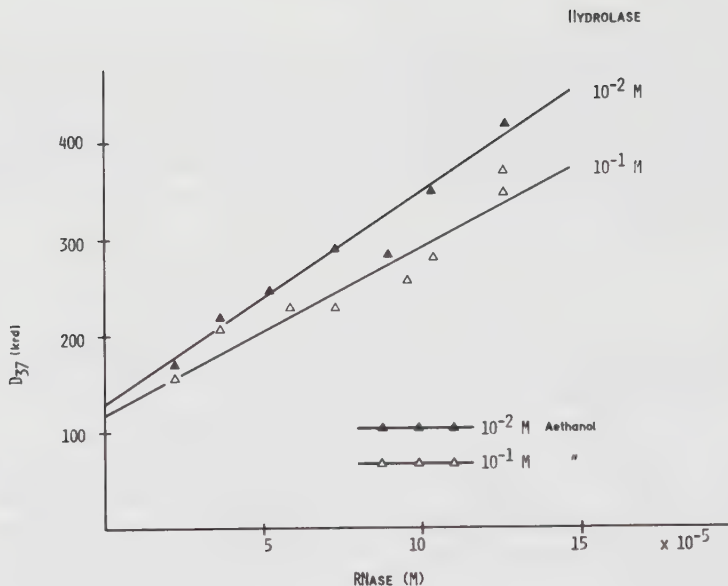


Abb. 9: D_{37} -Werte für die Hydrolasefunktion gemessen nach Bestrahlung der Ribonuclease in 0,01 M Phosphatpuffer unter Zusatz von 10^{-2} M bzw. 10^{-1} M Aethanol und N_2 -Sättigung in Abhängigkeit von der Ribonuclease-Konzentration.

Werte als bei 10^{-2} M Aethanol. Das zusätzliche Abfangen von $H^{\bullet}$ -Radikalen führt also nicht zu einer weiteren Erhöhung des Strahlenschutzes der beiden Enzymfunktionen, sondern das Enzym wird durch die Erhöhung der Aethanolkonzentration strahlenempfindlicher. Die Erniedrigung der D_{37} -Werte kann verschiedene Ursachen haben. Folgende Möglichkeiten sind denkbar:

- a) $H^{\bullet}$ -Radikale haben keine inaktivierende Wirkung, sondern sie können Strahlenschäden aufheben.
- b) In Gegenwart von 10^{-1} M Aethanol ist die native Konformation der Ribonuclease durch Störung der hydrophoben Wechselwirkungen im Enzymmolekül etwas verändert. Diese Veränderung kann zur Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit beitragen.

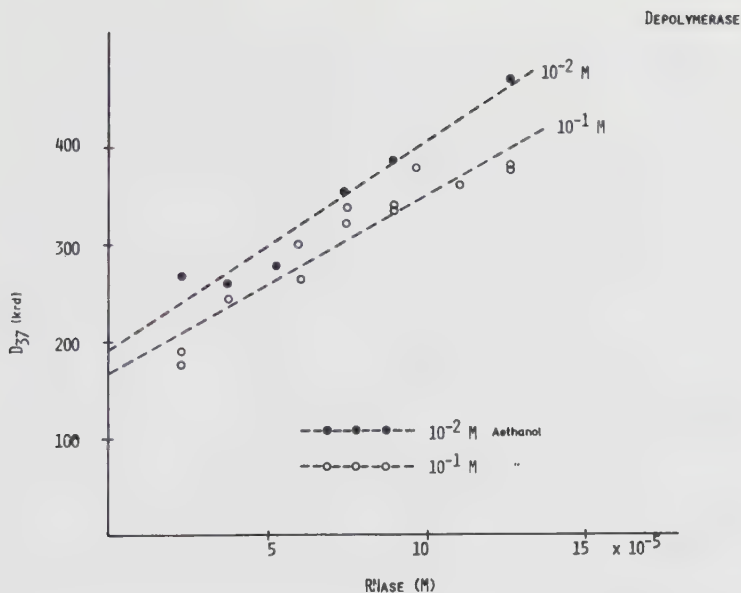


Abb. 10: D_{37} -Werte für die Depolymerasefunktion gemessen nach Bestrahlung der Ribonuclease in 0,01 M Phosphatpuffer unter Zusatz von 10^{-2} M bzw. 10^{-1} M Aethanol und bei N_2 -Sättigung in Abhängigkeit von der Ribonuclease-Konzentration.

c) Die beim Abfangen der Primärradikale entstandenen Aethanolradikale können mit der Ribonuclease reagieren und ihre Effektivität hinsichtlich der Inaktivierung ist größer als die der $H^\bullet$ -Radikale.

3.5 Strahleninaktivierung der Ribonuclease beim Abfangen der Primärradikale durch N_2O und Aethanol

Um zu untersuchen, ob Reaktionen der Aethanolradikale mit der Ribonuclease zur Inaktivierung der beiden Enzymfunktionen beitragen, wurden Bestrahlungsbedingungen gewählt, bei denen alle Primärradikale sehr weitgehend abgefangen werden und nur noch

die sekundär vorhandenen Aethanolradikale mit der Ribonuclease reagieren können. Führt man die Radiolyse des Enzyms unter N_2O in Gegenwart von 10^{-1} M Aethanol aus, so werden die solvatisierten Elektronen zunächst durch N_2O nach Gleichung (18) in OH-Radikale umgewandelt, die dann durch den großen Aethanolüberschuß abgefangen werden. So stehen unter diesen Bedingungen an Stelle der solvatisierten Elektronen nur Aethanolradikale zur Reaktion mit der Ribonuclease zur Verfügung. Falls Aethanolradikale nicht unter Inaktivierung mit dem Enzym reagieren, so muß man eine starke Erhöhung der D_{37} erwarten, wenn statt N_2 N_2O bei Bestrahlung in Gegenwart von 10^{-1} M Aethanol verwendet wird. Wie in Abb. 11 und 12 gezeigt wird, verändern sich die D_{37} -Werte für die beiden Funktionen im untersuchten Konzentrationsbereich innerhalb der Fehlergrenzen nicht. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß Aethanolradikale mit Ribonuclease reagieren und dabei beide Enzymfunktionen inaktiviert werden. Ein direkter experimenteller Beweis für die Reaktion der Aethanolradikale mit Ribonuclease wird unter 3.10 beschrieben.

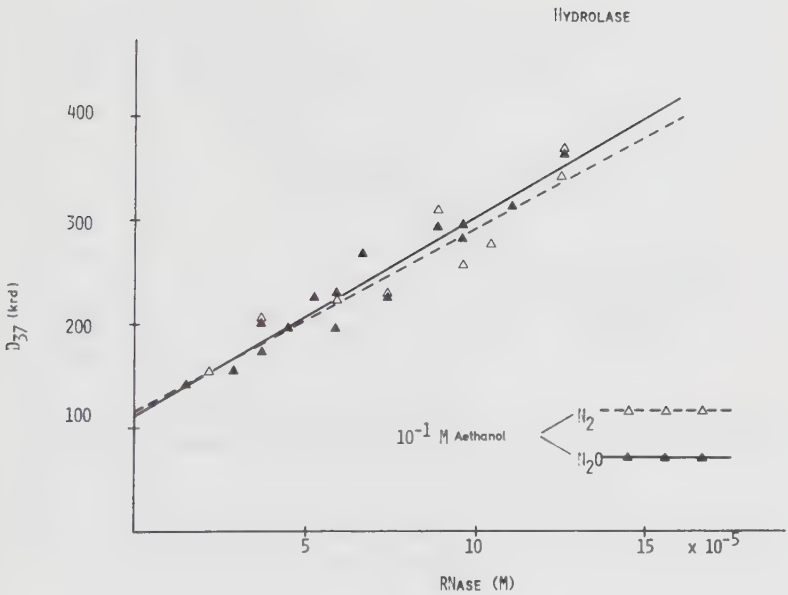


Abb. 11: D_{37} -Werte für die Hydrolasefunktion in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration nach Bestrahlen der Ribonuclease in 0,01 M Phosphatpuffer unter Zusatz von 10^{-1} M Aethanol unter N_2^- und N_2O^- -Sättigung.

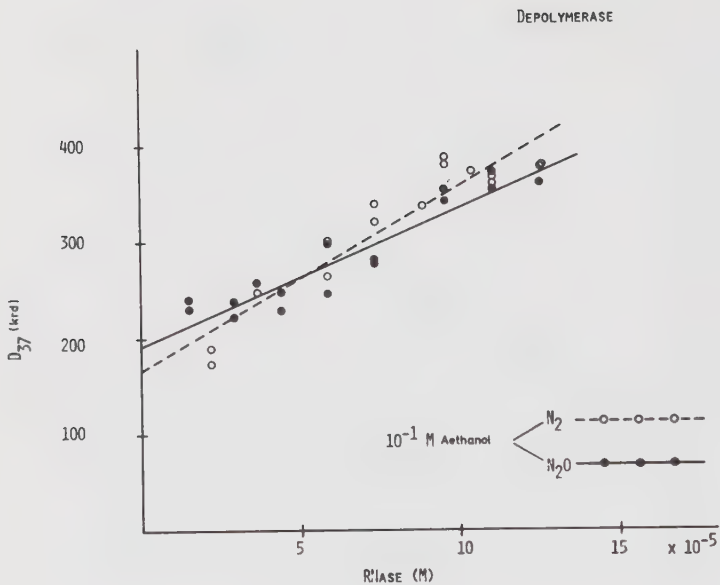


Abb. 12: D_{37} -Werte für die Depolymerasefunktion in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration nach Bestrahlen der Ribonuclease in 0,01 M Phosphatpuffer unter Zusatz von 10^{-1} M Aethanol unter N_2 - und N_2O -Sättigung.

3.6 Interpretation der Meßergebnisse nach der Gleichung von Sanner und Pihl

Um zu prüfen, ob eine Substanz, die man einer Enzymlösung zusetzt, inaktivierende Radikale abfängt, wird heute vielfach die 1967 von Sanner und Pihl angegebene Gleichung (8) (s. Seite 7) benutzt:

$$D_{37} = \frac{k_E}{\alpha \cdot k_i} \cdot E_O + \frac{k_P}{\alpha \cdot k_i} \cdot P + \frac{k_B}{\alpha \cdot k_i} \cdot B \quad (8)$$

Auch in dieser Arbeit soll nun versucht werden, die auf den vorhergehenden Seiten beschriebenen Meßergebnisse mit Hilfe dieser Gleichung zu interpretieren.

Bei der Aufstellung dieser Gleichung waren 2 Annahmen gemacht worden (s. Seite 5) und es soll zunächst überprüft werden, ob sie für die hier vorgelegten Untersuchungen zutreffen:

1. Das inaktivierte Enzym reagiert mit gleicher Geschwindigkeit mit den inaktivierenden Wasserradikalen wie das aktive Enzym (s. Gl. (6) und (7)).
2. Die Inaktivierung des Enzyms wird im wesentlichen durch eine Radikalsorte bedingt.

Wie auf Seite 7 gezeigt wurde, müßte bei gleichbleibender Geschwindigkeitskonstante des aktiven wie des inaktiven Enzyms für die Reaktion mit den inaktivierenden Wasserradikalen für die Abnahme des aktiven Enzyms eine exponentielle Abhängigkeit von der Dosis vorliegen (s. Gl. 7). Bei allen in dieser Arbeit gemessenen Dosis-Effekt-Kurven läßt sich der Verlust der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit von der Dosis innerhalb der Meßgenauigkeit als exponentielle Funktion beschreiben. Man kann daher annehmen, daß die erste Annahme entsprechend den Voraussetzungen erfüllt ist.

Nach der Gleichung (8) muß man bei der Auftragung von D_{37} über E_0 eine Gerade mit einer Steigung $\frac{k_E}{\alpha \cdot k_i}$ erhalten. Wenn der Enzymlösung keine Fängersubstanz zugesetzt ist, entspricht der Abschnitt auf der Ordinate $\frac{k_B}{\alpha \cdot k_i}$ B. Setzt man der Enzymlösung eine Substanz zu, die die inaktivierenden Radikale abfängt, vergrößert sich der Abschnitt um $\frac{k_P}{\alpha \cdot k_i}$ P, dabei sollte das Verhältnis $\frac{k_E}{k_i}$ aber konstant bleiben. Bei allen untersuchten Bestrahlungsbedingungen ließ sich die Abhängigkeit der D_{37} von der Enzymkonzentration mit guter Korrelation als lineare Funktion angeben. Aus den gemessenen D_{37} -Werten wurde nach Gleichung (8) unter Benutzung einer linearen Regressionsmethode die Werte für Steigung und Ordinatenabschnitt für die verschiedenen Bestrahlungsbedingungen berechnet. Die gefundenen Werte sind mit Angabe ihrer Fehler in Tabelle 2 zusammengestellt.

In zahlreichen Untersuchungen /47-49/ wurde gefunden, daß Enzyme im wesentlichen durch die Reaktion mit den $OH^\bullet$ -Radikalen inaktiviert werden. Nimmt man diesen Fall auch für die Ribonuclease an, so läßt sich die Wirkung vom Zusatz von 10^{-3} M Aethanol auf die Hydrolase-Funktion entsprechend interpretieren. Das Verhältnis $\frac{k_E}{k_i}$ ändert sich nicht innerhalb der Meßgenauigkeit, während aber durch das Abfangen der $OH^\bullet$ -Radikale der Ordinatenabschnitt sich entsprechend $\frac{k_P}{\alpha \cdot k_i}$ (P) um etwa 100 krd vergrößert. Für diesen Fall läßt sich der Strahlenschutz der Enzymfunktion aufgrund der Fängerwirkung mit dieser Gleichung befriedigend beschreiben. Als Resultat ergibt sich danach, daß Reaktionen der OH -Radikale die Inaktivierung bewirken. Steigert man die Konzentration von 10^{-2} M auf 10^{-1} M Aethanol, so findet man trotz des zehnfach größeren Wertes für P keine Vergrößerung des Ordinatenabschnittes und gleichzeitig ändert sich das Verhältnis von $\frac{k_E}{\alpha \cdot k_i}$ zu einem kleineren Wert. Unter der Annahme, daß nur OH -Radikale die Inaktivierung bewirken, läßt sich dieses Ergebnis nur damit erklären, daß k_i größer geworden ist, d.h. unter diesen Bedingungen wären weniger Reaktionen mit $OH^\bullet$ -Radikalen zur Inaktivierung des Enzyms erforderlich.

Bestrahlungsbedingungen	$\frac{k_E}{\alpha \cdot k_i} \cdot 10^{-6} \left(\frac{\text{krd}}{M} \right)$		$\frac{k_P}{\alpha \cdot k_i} \cdot P + \frac{k_B}{\alpha \cdot k_i} \cdot B \text{ (krd)}$	
	Hydrolase	Depolymerase	Hydrolase	Depolymerase
N ₂ ohne Zusatz	2,13 ± 0,09	1,55 ± 0,11	25,6 ± 6,6	54,2 ± 9,1
N ₂ O ohne Zusatz	1,36 ± 0,13	1,34 ± 0,19	112,3 ± 10,8	133,1 ± 16,1
N ₂ + 10 ⁻² M Aethanol	2,05 ± 0,26	2,20 ± 0,26	133,1 ± 20,7	192,5 ± 19,1
N ₂ + 10 ⁻¹ M Aethanol	1,52 ± 0,21	1,90 ± 0,23	132,3 ± 16,9	166,8 ± 20,2
N ₂ O + 10 ⁻¹ M Aethanol	1,97 ± 0,12	1,38 ± 0,20	98,9 ± 9,1	199,6 ± 13,2

Tabelle 2: Werte für Steigung und Ordinatenabschnitt nach der Gleichung

$$D_{37} = \frac{k_E}{\alpha \cdot k_i} E_O + \frac{k_P}{\alpha \cdot k_i} P + \frac{k_B}{\alpha \cdot k_i} \cdot B$$

Andererseits wurde aber bereits gezeigt (s. Seite 47), daß in Gegenwart von 10^{-1} M Aethanol und Konzentrationen bis zu 10^{-4} M Ribonuclease nur noch weniger als 2 % der $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale mit dem Enzym reagieren können. Dadurch ist bei den gemessenen D_{37} -Werten die Annahme, daß nur $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale die Inaktivierung bewirken, recht unwahrscheinlich. Das Gleiche gilt für die Strahleninaktivierung von Ribonuclease unter N_2O und mit Zusatz von 10^{-1} M Aethanol. Unter dieser Versuchsbedingung können nur Aethanolradikale - abgesehen von einem sehr kleinen Anteil $\text{H}^{\bullet}$ -Radikale - die gefundene Inaktivierung bewirkt haben. Auch die Meßergebnisse, die nach Bestrahlung unter N_2O erhalten wurden, lassen sich nicht mit der Annahme erklären, daß die Inaktivierung nur durch $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale bewirkt wird. Zumindest bei niedrigen Ribonuclease-Konzentrationen wirkt sich das Abfangen der Elektronen als eindeutiger Strahlenschutz aus. Aufgrund unserer Messungen muß man annehmen, daß die Voraussetzung 2 für die Gleichung (8) bei der Strahleninaktivierung der Ribonuclease offenbar nicht zutrifft und sie deswegen nicht zur weiteren Interpretation der Meßergebnisse verwendet werden kann.

3.7 Interpretation der Meßergebnisse nach dem Verfahren von Mee, Adelstein und Stein

Für den Fall, daß verschiedene Radikale die Inaktivierung eines Enzyms bewirken, geben Mee, Adelstein und Stein /50/ eine Gleichung an, nach der die Beteiligung der einzelnen Radikalsorten am Inaktivierungsprozess abgeschätzt werden kann:

$$G_{\text{Inakt.}} = \sum G_i f_i \quad (42)$$

wobei G_i der G-Wert der Radikalsorte i ist und f_i der Anteil der Radikale, der Inaktivierung bewirkt. Dieser wirk-
same Anteil der einzelnen Radikalsorten (fractional effi-
ciency) wurde von den genannten Autoren berechnet und durch
die Lösung der 3 Gleichungen:

$$1) \quad G(\text{Inakt. unter } N_2) = G_{OH} \cdot f_{OH} + G_H \cdot f_H + G_{e_{aq}^-} \cdot f_{e_{aq}^-}$$

$$2) \quad G(\text{Inakt. unter } N_2O) = G_{OH} \cdot f_{OH} + G_H \cdot f_H$$

$$3) \quad G(\text{Inakt. bei } 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M t-but. u. } N_2) = G_H \cdot f_H + G_{e_{aq}^-} \cdot f_{e_{aq}^-}$$

Die G-Werte für die Erzeugung der Primärradikale $OH^\cdot$, $H^\cdot$ und solvatisierten Elektronen unter N_2 und N_2O wurden aus der Li-
teratur /19/ entnommen. Dabei wurde allerdings nicht berück-
sichtigt, daß auch in Gegenwart einer Fängersubstanz bei aus-
reichender Enzymkonzentration ein Teil der entsprechenden Ra-
dikalsorte nicht der Reaktion mit dem Enzym entzogen wird.

Dieses Verfahren wurde aber unter Berücksichtigung der kompete-
tierenden Reaktionen auch auf die hier vorgelegten Meßergebnisse
angewendet. Dabei wurden die in Tabelle 3a und 3b angegebenen
G-Werte verwendet. Für die Berechnung der G-Werte wurde der
entsprechende Wert für die D_{37} aus den berechneten Geraden
entnommen. Die g_i -Werte der Primärradikale in Gegenwart von
Fängern wurden aufgrund der kompetetierenden Reaktionen von
Ribonuclease und Fänger nach Gleichung (39)

$$g_i = G_i \frac{k_{iE}(E_O)}{k_{iE}(E_O) + k_{iP}(P)}$$

berechnet und anstelle von G_i in Gleichung (42) zur Berechnung
der Effektivität f_i benutzt:

$$G_{\text{Inakt.}} = \sum g_i f_i \quad (43)$$

Für eine Konzentration von $7,31 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ Ribonuclease erhält man

Bestrahlungsbedingungen	G (Inaktivierung)		G - Werte für			
	Hydrolase	Depolymerase	OH [•]	H [•]	e _{aq}	Aeth [•]
N ₂	0,239	0,253	2,70	0,58	2,65	0
N ₂ + 10 ⁻² M C ₂ H ₅ OH	0,157	0,125	0,38	0,52	2,65	2,38
N ₂ + 10 ⁻¹ M C ₂ H ₅ OH	0,183	0,146	0,05	0,28	2,65	2,95
N ₂ O + 10 ⁻¹ M C ₂ H ₅ OH	0,176	0,151	0,11	0,28	0	5,54
N ₂ O	0,212	0,193	5,35	0,58	0	0

Tabelle 3a: G-Werte für die Strahleninaktivierung von Ribonuclease bei einer Konzentration von 1 mg/ml = 7,31 · 10⁻⁵M.

$$G \left(\frac{\text{inakt. Moleküle}}{100 \text{ eV}} \right) = 9,65 \cdot 0,63 \cdot 10^5 \cdot \frac{E_0(M)}{D_{37}(\text{krd})}$$

Bestrahlungsbedingungen	G (Inaktivierung)		g - Werte für		
	Hydrolase	Depolymerase	OH [•]	H [•]	e _{aq} [•] Aeth [•]
N ₂	0,261	0,314	2,70	0,58	2,65 0
N ₂ + 10 ⁻² M C ₂ H ₅ OH	0,197	0,173	0,67	0,54	2,65 2,07
N ₂ + 10 ⁻¹ M C ₂ H ₅ OH	0,240	0,194	0,09	0,33	2,65 2,86
N ₂ O + 10 ⁻¹ M C ₂ H ₅ OH	0,227	0,225	0,18	0,33	0 5,42
N ₂ O	0,291	0,271	5,35	0,58	0 0

Tabelle 3b: g-Werte für die Strahleninaktivierung von Ribonuclease bei einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-4}$ M Ribonuclease.

dann folgende 3 Gleichungen:

Bestrahlungs- bedingungen	$g_1 f_1$	= $G_{\text{Inakt.}}$
N_2	: $2,70 f_{OH} + 0,58 f_H + 2,65 f_{e_{aq}}^-$	= 0,239
$N_2 + 10^{-2} M C_2H_5OH$	: $0,38 f_{OH} + 0,52 f_H + 2,65 f_{e_{aq}}^-$	= 0,157
N_2O	: $5,35 f_{OH} + 0,58 f_H + 0 f_{e_{aq}}^-$	= 0,212

Man erhält daraus für:

$$f_{OH} = 0,03$$

$$f_H = 0,05$$

$$f_{e_{aq}}^- = 0,04$$

Setzt man diese Werte in die Gleichung ein, die bei der Strahleninaktivierung unter N_2O in Gegenwart von $10^{-1} M$ Aethanol anzuwenden wäre, dann errechnet man einen G-Wert für die Inaktivierung, der nur $\frac{1}{10}$ des gemessenen Wertes beträgt:

$$N_2O + 10^{-1} M \text{ Aeth.} : 0,11 f_{OH} + 0,28 f_H = G_{\text{Inakt.}}$$

$$0,11 \cdot 0,03 + 0,28 \cdot 0,05 = 0,017$$

Da man aufgrund unserer Messungen annehmen kann, daß auch die Aethanolradikale mit der Ribonuclease bei der Radiolyse reagieren, wurden von uns bei der Abschätzung der Effektivität der Radikale auch die Aethanolradikale berücksichtigt. Zur Berechnung der 4 Unbekannten wurden dabei die 4 Gleichungen benutzt, die man bei der Verwendung von Aethanol als Fänger-substanz und unter N_2 ohne Fänger erhält. Mit den G-Werten aus Tabelle 3a erhält man für die Inaktivierung der Hydrolase unter den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen folgende Gleichungen:

Bestrahlungs- bedingungen	$g_i f_i$	= $G_{\text{Inakt.}}$
N_2	$: 2,70f_{OH} + 0,58f_H + 2,65f_{e_{aq}} + 0 f_{eth}$	$= 0,239$
$N_2/10^{-2}M C_2H_5OH$	$: 0,38f_{OH} + 0,52f_H + 2,65f_{e_{aq}} + 2,38f_{eth}$	$= 0,157$
$N_2/10^{-1}M C_2H_5OH$	$: 0,05f_{OH} + 0,28f_H + 2,65f_{e_{aq}} + 2,95f_{eth}$	$= 0,183$
$N_2O/10^{-1}MC_2H_5OH$	$: 0,11f_{OH} + 0,28f_H + 0 f_{e_{aq}} + 5,54f_{eth}$	$= 0,176$

Für die Inaktivierung der Depolymerase setzt man die entsprechenden Werte für $G(\text{Inaktivierung})$ aus Tabelle 3a ein. Die Lösungen der Gleichungen ergeben folgende Effektivitäten der Radikale für die Inaktivierung:

	für Hydrolase	für Depolymerase
$f_{OH\cdot}$	0,08	0,09
$f_{H\cdot}$	-0,13	-0,14
f_{e^-}	0,04	0,03
$f_{aeth\cdot}$	0,04	0,03

Für die Effektivität der $H\cdot$ -Radikale erhält man einen negativen Wert, da das Abfangen der $H\cdot$ -Radikale keine Erhöhung der D_{37} zur Folge hat. Da man annimmt, daß Reaktionen der Primär-radikale mit dem Enzym nur Inaktivierung bewirken können, sollten negative Werte für die Effektivität eigentlich nicht auftreten. Setzt man die gefundenen Werte für die Effektivität der Radikale in die Gleichung ein, die die Inaktivierung unter N_2O beschreibt, so berechnet man einen um etwa 40 % höheren G-Wert für die Inaktivierung als die Messung ergibt:

$$N_2O : \quad 5,35 f_{OH} + 0,58 f_H = G(\text{Inakt. } N_2O)$$

$$5,35 \cdot 0,08 - 0,58 \cdot 0,13 = 0,353$$

Führt man die Abschätzung der Beteiligung der Radikale bei einer höheren Ribonuclease-Konzentration von $10^{-4}M$ durch,

so erhält man für die Hydrolase folgende f_1 -Werte:

$$f_{OH\cdot} = 0,07; f_{H\cdot} = -0,13; f_{e-} = 0,05; f_{aeth\cdot} = 0,05;$$

Setzt man diese Werte für die Strahleninaktivierung unter N_2O ein, so berechnet man einen G-Wert, der nur noch 17 % oberhalb des gemessenen Wertes liegt. Bei einer Ribonuclease-Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-4} M$ berechnet man schließlich einen G-Wert für die Inaktivierung unter N_2O , der nur noch um 10 % größer als der gemessene Wert ist. Die bessere Übereinstimmung der berechneten und gemessenen G-Werte für die Inaktivierung unter N_2O , bei Erhöhung der Enzymkonzentration läßt vermuten, daß der Anteil der Reaktionen der Radikale mit Verunreinigungen, die bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt wurden, bei höherer Enzymkonzentration sich verringert.

Die Betrachtung der Meßergebnisse aufgrund der Gleichung (43) hat ergeben, daß die Beteiligung der Aethanolradikale an der Strahleninaktivierung der Ribonuclease sehr wahrscheinlich ist. Die Abschätzung über den Grad der Beteiligung der einzelnen Radikalsorten ergab für Aethanolradikale und für solvatisierte Elektronen keinen Unterschied. Für den wirksamen Anteil der $OH\cdot$ -Radikale $f_{OH\cdot}$ erhielt man stets einen höheren Wert als für die solvatisierten Elektronen. Der negative Wert für die Effektivität der $H\cdot$ -Radikale ist schwer zu verstehen und gibt zu Bedenken Anlaß, ob die angegebene Gleichung ausreicht, die Beteiligung der Radikale an der Inaktivierung zu ermitteln.

3.8 Berechnung der Effektivitäten der Primärradikale unter Berücksichtigung der Verunreinigungen

Bei der Berechnung der Wirksamkeit der Radikale, wie sie im vorangegangenen Kapitel durchgeführt wurde, könnte es unter Umständen ein Fehler sein, daß man dabei die G-Werte, die man in der Literatur findet und die in sehr reinem Wasser gemessen wurden, benutzt. Bei der Strahleninaktivierung von Enzymen verwendet man aber Pufferlösungen, in denen möglicherweise

die Menge der Primärradikale, die mit dem Enzym reagiert, verändert ist. Dabei kann auch durch die Puffersubstanz oder durch Verunreinigungen eine Radikalsorte bevorzugt werden, wodurch die Mengenverhältnisse der Radikalsorten nicht den Literaturangaben entspricht. Die möglichen Reaktionen der Radikale mit Verunreinigungen als auch der Radikale untereinander werden im folgenden Ansatz berücksichtigt. Hoard, Hayes und Goad /51/ haben 1974 eine Analyse durchgeführt, bei der die Beteiligung der verschiedenen Wasserradikale beim Verlust der UV-Absorption der Thymidyllderivate durch Radiolyse ermittelt wurde. In Kenntnis dieser Arbeit wurde entsprechend für die hier vorgelegten Messungen eine Gleichung aufgestellt, nach der die Beteiligung der Radikale am Inaktivierungsprozeß ermittelt werden kann. Statt wie in dem vorangegangenen Abschnitt den g_i -Wert der Radikale nur im Hinblick auf die kompetitive Reaktion mit dem Fänger zu errechnen, wird jetzt noch angenommen, daß ein Teil der Radikale durch die Puffersubstanz oder durch Verunreinigungen von der Reaktion mit dem Enzym gehindert wird. Danach ist

$$g_i = G_i \frac{k_{iE} (E_O)}{k_{iE} (E_O) + k_{iP} P + \beta_i} \quad (44)$$

wobei k_{iE} = k für die Reaktion des Radikals i mit dem Enzym

k_{iP} = k für die Reaktion des Radikals i mit P ist.

β_i = Reaktionsgeschwindigkeit des Radikals i mit anderen Substanzen der Lösung außer Enzym und Fänger.

Man nimmt bei β_i an, daß die Konzentration der Substanzen bei den verschiedenen Messungen konstant ist, aber daß die Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen Radikalsorten unterschiedlich groß ist. Dieser Ausdruck für g_i wird dann in die Gleichung:

$$G \text{ (Inakt.)} = \sum g_i f_i \quad (43)$$

eingesetzt. Zusätzlich zu den Unbekannten f_i werden nun auch die Unbekannten β_i berechnet.

Zunächst wurde diese Berechnung aber nur für die Meßreihen durchgeführt, bei denen kein Aethanolradikal entsteht, da die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des Aethanolradikals mit Ribonuclease unbekannt ist. Damit reduziert sich die Gleichung (44) auf den Ausdruck

$$g_i = G_i \frac{k_{iE}(E_O)}{k_{iE}(E_O) + \beta_i}$$

Zur Bestimmung von f_i und β_i für die hydratisierten Elektronen, $OH^\cdot$ - und $H^\cdot$ -Radikalen aus Gleichung (43) wurden die für die verschiedenen Ribonuclease-Konzentrationen gefundenen G-Werte für die Inaktivierung der Hydrolase-Funktion bei Bestrahlung unter N_2 und unter N_2O eingesetzt. Das in den Parametern f_i und β_i nichtlineare Gleichungssystem wurde unter Verwendung der gemessenen 13 G-Werte für die Inaktivierung nach der Methode der kleinsten Summe der Fehlerquadrate mit einem Näherungsverfahren iterativ gelöst. Da negative Werte für die Effektivität vom Mechanismus nicht verständlich sind und da bei diesen Messungen auch kein Aethanol verwendet wurde, das eine Veränderung des Meßsystems bewirken kann wie auf S. 48 angegeben, wurde als Zusatzbedingung eingeführt, daß die Werte f_i zwischen 0 und +1 liegen müssen. Bei der Berechnung, die mit einem Variationsverfahren auf einem Rechner PDP 11/45 durchgeführt wurde, ging man von verschiedenen Ausgangswerten für f_i und β_i aus. Setzte man die Anfangswerte für alle f_i gleich 0,01, und für alle β_i gleich 10^3 , so erhielt man:

$$\begin{array}{ll} f_{OH^\cdot} = 0,068 & \beta_{OH^\cdot} = 1,29 \cdot 10^6 \\ f_{H^\cdot} = 0,49 \cdot 10^{-6} & \beta_{H^\cdot} = 9,1 \cdot 10^4 \\ f_{e_{aq}^-} = 0,055 & \beta_{e_{aq}^-} = 3,6 \cdot 10^4 \end{array}$$

Setzte man die Anfangswerte für alle f_i gleich 0,9 und für alle β_i gleich $9 \cdot 10^4$, so erhielt man sehr ähnliche Werte:

$$\begin{array}{ll} f_{OH\cdot} = 0,068 & \beta_{OH\cdot} = 1,29 \cdot 10^6 \\ f_{H\cdot} = 0,306 \cdot 10^{-6} & \beta_{H\cdot} = 3,6 \cdot 10^4 \\ f_{e_{aq}^-} = 0,055 & \beta_{e_{aq}^-} = 3,6 \cdot 10^4 \end{array}$$

Die Summe der Fehlerquadrate war in beiden Fällen $2,335 \cdot 10^{-3}$.

Aus diesen Berechnungen ergibt sich also, daß in dem von uns untersuchten System die $OH\cdot$ -Radikale nur etwas effektiver sind bei der Inaktivierung der Ribonuclease als die hydratisierten Elektronen, während sich für die $H\cdot$ -Radikale kein Beitrag bei der Inaktivierung nachweisen läßt. Aufgrund der berechneten β -Werte muß man annehmen, daß durch die Verunreinigungen in den wäßrigen Lösungen ein Teil der $OH\cdot$ -Radikale abgefangen wird, während die Reaktionen der Verunreinigungen mit $H\cdot$ -Radikalen und mit den hydratisierten Elektronen unbedeutend sind. Allerdings ist auch für die OH -Radikale bei Messungen in Gegenwart von Aethanol der Effekt durch die Verunreinigungen unbedeutend. Ohne Zusatz von Fängersubstanzen können möglicherweise 20 - 50 % der OH -Radikale je nach Enzymkonzentration durch die Verunreinigung an der Reaktion mit dem Enzym gehindert werden.

Die hier berechneten Werte für die Effektivität der Radikale bei der Inaktivierung gelten nur für das beschriebene System unter der Voraussetzung, daß die aus der Literatur entnommenen Werte für k_i zutreffen und die Effektivität sich in der angegebenen Weise addiert.

3.9 Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung der Ribonuclease in Gegenwart von Fängersubstanzen

Bei Untersuchungen über die Strahleninaktivierung der Enzyme stellt sich die Frage, welche chemischen Veränderungen am Molekül bedingen den Verlust der enzymatischen Aktivität. Da man nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf Proteinlösungen eine Veränderung in der Aminosäurezusammensetzung

beobachtet, wird häufig angenommen, daß möglicherweise durch die Radiolyse bestimmte Aminosäuren abgebaut werden, wodurch das Enzym inaktiviert wird. So nimmt Augenstein /13/ an, daß die Zerstörung der Disulfidbrücken des Cystins die chemische Reaktion ist, die den Verlust der biologischen Aktivität zur Folge hat. Smith und Adelstein /52/ zeigen, daß eine Korrelation zwischen Verlust von Tyrosin und enzymatischer Aktivität besteht, während Adams /47/ und Mitarbeiter einen Zusammenhang zwischen Abbau von Tryptophan und Inaktivierung finden. Man nimmt allgemein /53/ an, daß die Aminosäurereste im Protein durch Reaktionen der OH-Radikale und der solvatisierten Elektronen zerstört werden, da ihre Reaktionen mit den strahlenempfindlichen Aminosäuren hohe Geschwindigkeitskonstanten aufweisen. Es ist aber andererseits fraglich, ob die bei den freien Aminosäuren gefundenen Geschwindigkeitskonstanten beim Abbau der Aminosäurereste im Protein von Bedeutung sind, da ihre Reaktivität allein durch die Seitenkette bedingt ist, während an Stelle der Amino- und Carboxylgruppe die Peptidbindungen treten. Von allen Aminosäuren sind die Geschwindigkeitskonstanten ihrer Reaktionen mit OH'-Radikalen und mit solvatisierten Elektronen gemessen worden. Die folgenden 7 Reaktionen verlaufen mit den höchsten Geschwindigkeitskonstanten:

<u>R e a k t i o n</u>	<u>k (M⁻¹sec⁻¹)</u>
(H·Cys·OH) ₂ + e ⁻ _{aq}	1,3 · 10 ¹⁰
H·Tyr·OH + OH·	5,8 · 10 ⁹
H·Met·OH + OH·	4,9 · 10 ⁹
H·His·OH + e ⁻ _{aq}	3,9 · 10 ⁹
H·Phe·OH + OH·	3,5 · 10 ⁹
(H·Cys·OH) ₂ + OH·	3,2 · 10 ⁹
H·His·OH + OH·	3,0 · 10 ⁹

Leider sind Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen der H'- sowie der Aethanolradikale mit den Aminosäuren nicht be-

kannt.

Wenn eine Proteinlösung unter vier verschiedenen Bedingungen bestrahlt wird, so daß die Radiolyse des Proteins durch unterschiedliche Zusammensetzung der Radikale erfolgt, so sollten die Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung der bestrahlten Proteinproben verglichen mit dem nativen Protein Aufschluß über die Effektivität in der Zerstörung bestimmter Aminosäuren geben. Die Aminosäureanalysen an Enzymproben, die in Gegenwart verschiedener Fängersubstanzen durch Einwirkung ionisierender Strahlen inaktiviert wurden, sollten auch eine besser gesicherte Aussage über die Korrelation der Zerstörung einer Aminosäure und der Inaktivierung zulassen, als wenn nur unter einer Bedingung mit verschiedenen Dosen gleichzeitiger Verlust einer Aminosäure und der enzymatischen Aktivität gemessen wird, wie es in den bisherigen Arbeiten der Fall war.

Für die hier vorgelegte Arbeit wurden Aminosäureanalysen an Ribonuclease-Proben durchgeführt, die in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0 unter sechs unterschiedlichen Bedingungen bestrahlt wurden. Bei diesen Bestrahlungen wurde ähnlich wie bei der Strahleninaktivierung durch Zusatz von Aethanol und N_2O die Zusammensetzung der mit Ribonuclease reagierenden Radikale variiert. Die native und die bestrahlte Ribonuclease wurde mit 6 N HCL bei 110° 22 Stunden hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse wurde wie unter 2.6 beschrieben, durchgeführt.

Um einen Überblick über alle gemessenen Werte und ihre Fehlerbreiten zu geben, wurden in Tabelle 4 die Ergebnisse aller Aminosäureanalysen zusammengefaßt. Die erhaltenen Meßwerte der bestrahlten Ribonuclease-Proben wurden als Prozente der entsprechenden Aminosäure der nativen Ribonuclease angegeben. Bei der Berechnung wurde Valin in jedem Chromatogramm als Bezugsaminosäure genommen, da es sich mit großer Genauigkeit bestimmen läßt und da sich bereits bei früheren Untersuchungen gezeigt hatte, daß diese Aminosäure sehr strahlenresistent ist, wie es auch bei den beiden anderen Aminosäuren, Isoleucin und Leucin, der Fall ist, die wie Valin nur eine Kohlenwasserstoff-

	N ₂ ohne Zusatz	N ₂ 10 ⁻² M C ₂ H ₅ OH	N ₂ O ohne Zusatz	N ₂ O 10 ⁻² M C ₂ H ₅ OH	N ₂ 10 ⁻¹ M C ₂ H ₅ OH	N ₂ O 10 ⁻¹ M C ₂ H ₅ OH
Asparaginsäure	94,1 ± 1,2	96,4 ± 3,0	100,5 ± 0,2	100,7 ± 1,1	98,4 ± 1,4	100,8 ± 2,8
Threonin	99,6 ± 0,5	102,5 ± 1,1	95,5 ± 3,4	99,4 ± 1,6	103,4 ± 3,2	101,9 ± 2,3
Serin	101,9 ± 5,2	103,4 ± 4,1	97,3 ± 3,8	100,6 ± 0,9	99,7 ± 3,0	107,1 ± 5,4
Glutaminsäure	99,5 ± 3,9	101,4 ± 4,3	101,7 ± 0,4	100,4 ± 2,6	104,2 ± 0,6	101,0 ± 0,1
Prolin	87,6 ± 0,6	84,9 ± 10,6	86,6 ± 14,2	80,0 ± 2,9	82,6 ± 8,5	93,3 ± 13,7
Glycin	100,0 ± 5,4	99,0 ± 10,7	101,8 ± 2,6	97,3 ± 0,5	91,9 ± 0,4	103,4 ± 7,3
Alanin	106,2 ± 1,5	104,9 ± 2,7	104,0 ± 0,3	101,1 ± 0,7	104,0 ± 1,1	102,0 ± 1,0
$\frac{1}{2}$ Cystin	74,6 ± 7,7	82,3 ± 12,6	71,3 ± 5,6	72,8 ± 6,9	79,7 ± 9,1	90,0 ± 15,9
Valin	100	100	100	100	100	100
Methionin	78,0 ± 5,3	81,2 ± 1,4	80,9 ± 0,9	82,6 ± 0,8	89,3 ± 0,7	91,6 ± 0,14
Isoleucin	100,5 ± 5,5	98,3 ± 6,9	101,5 ± 6,2	97,9 ± 3,5	99,6 ± 2,4	100,2 ± 1,4
Leucin	99,2 ± 9,6	98,9 ± 6,9	99,3 ± 9,1	105,0 ± 10,5	100,5 ± 4,7	102,8 ± 1,5
Tyrosin	66,0 ± 5,9	77,3 ± 8,8	71,7 ± 6,2	78,7 ± 4,3	80,5 ± 0,8	89,5 ± 3,2
Phenylalanin	92,6 ± 3,0	95,4 ± 6,3	86,8 ± 1,2	99,2 ± 1,1	94,3 ± 2,1	96,7 ± 8,6
Histidin	89,2 ± 2,3	85,8 ± 4,4	80,0 ± 0,9	70,0 ± 3,7	85,1 ± 2,1	62,0 ± 1,3
Lysin	94,4 ± 2,6	90,4 ± 5,2	87,5 ± 4,4	88,2 ± 2,7	98,1 ± 2,0	91,8 ± 4,0
Arginin	93,7 ± 2,7	93,7 ± 0,7	87,8 ± 3,8	91,5 ± 1,1	98,5 ± 4,5	96,6 ± 1,7

Tabelle 4 Aminosäureanalysen von Ribonucleaseproben, die in einer Konzentration von 1 mg/ml in 10⁻² M Phosphatpuffer pH 7,0 mit 480 krd bestrahlt wurden.

kette als Seitenkette haben. Aus der Tabelle 4 ist zu ersehen, daß die meisten Aminosäuren trotz der hohen Dosis keinen meßbaren Abbau zeigen. Unter fast allen Bestrahlungsbedingungen wurde ein Abbau bei Prolin, Cystin, Methionin, Tyrosin, Histidin und Lysin gefunden. Für Phenylalanin und Arginin ist nur nach Bestrahlung unter N_2O ein Verlust meßbar. Die Werte sind Mittelwerte von mind. 6 Aminosäureanalysen, die an 2 verschiedenen Hydrolysaten (oder auch mehr) gemacht wurden. Der Fehler ist angegeben als mittlere Standardabweichung. Bei der Bestimmung von Prolin und Cystin ist dieser Fehler größer als bei anderen Aminosäuren. Die Prolinbestimmung ist immer mit einem größeren Fehler behaftet, da die Farbausbeute mit dem Bestimmungsreagenz Ninhydrin beim Prolin um 75 % kleiner als bei den übrigen Aminosäuren ist. Der große Fehler bei der Cystinbestimmung ist bedingt durch die Hydrolyseempfindlichkeit des Cystins. Während bei Cystinbestimmungen von einem Hydrolysat der Fehler kleiner als 3 % ist, findet man bei Analysen von verschiedenen Hydrolysaten von nativer Ribonuclease bereits einen Fehler von 10 %. Bei bestrahlten Proben ist der Fehler dann häufig noch größer. Ähnliche Beobachtungen haben auch Slobodian und Mitarbeiter /54/ gemacht.

In der folgenden Tabelle 5 sind von den strahlenempfindlichen Aminosäuren die Verluste in % der Kontrolle und die G-Werte für den Abbau der Aminosäurereste angegeben. Vier von diesen Aminosäuren gehören zu denjenigen, deren Reaktionen mit $OH^\bullet$ -Radikalen oder solvatisierten Elektronen die höchsten Geschwindigkeitskonstanten von allen Aminosäuren haben (s. Seite 66).

Bei Prolin und Lysin findet man allerdings um eine Größenordnung kleinere Geschwindigkeitskonstanten. Daher war es naheliegend, zunächst anzunehmen, daß der Abbau bei Cystin, Methionin, Tyrosin und Histidin durch $OH^\bullet$ -Radikale und solvatisierte Elektronen bewirkt wird. Diese Annahme führt jedoch bei quantitativer Betrachtung zu Schwierigkeiten. Methionin z.B. reagiert schnell mit $OH^\bullet$ -Radikalen, aber nur sehr langsam mit Elektronen ($k_{e^{aq-2}} + Met = 3,5 \cdot 10^7 M^{-1} s^{-1}$). Werden die $OH^\bullet$ -Radikale durch 10^{-2} M Äthanol abgefangen, so verändert sich der Abbau von Methionin nur sehr wenig. Auch eine Erhöhung

Z	A S	N ₂ /ohne		N ₂ /10 ⁻² M Aeth.		N ₂ /10 ⁻¹ M Aeth.		N ₂ O		N ₂ O/10 ⁻² M Aeth.		N ₂ O/10 ⁻¹ M Aeth.	
		%	G	%	G	%	G	%	G	%	G	%	G
8	Cys	25	0,294	18	0,217	20	0,235	23	0,271	27	0,318	10	0,118
4	Met	22	0,129	19	0,112	11	0,065	19	0,112	17	0,100	8	0,047
6	Tyr	34	0,300	23	0,202	19	0,168	28	0,247	21	0,185	10	0,088
4	His	11	0,065	14	0,082	15	0,088	20	0,118	30	0,176	38	0,223
10	Lys	6	0,088	10	0,147	2	0,029	12	0,176	12	0,176	8	0,118

Tabelle 5: Abgebaute Aminosäurereste in % und G-Werte für die Zerstörung nach 480 krd

$$G = 9,65 \cdot 10^5 \cdot \frac{7,31 \cdot 10^{-5} \cdot z \cdot \%}{480 \cdot 100} = 0,147 \cdot z \cdot \frac{\%}{100}$$

der $\text{OH}^\bullet$ -Radikalausbeute bei Bestrahlung unter N_2O bewirkt keinen höheren Verlust an Methionin. Ein ähnliches Verhalten findet man auch bei Tyrosin, dessen Abbau sich bei Bestrahlung unter N_2O ebenfalls verglichen mit der Radiolyse unter N_2 nicht erhöht, obwohl seine Geschwindigkeitskonstante mit $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen zehnmal größer ist als mit den solvatisierten Elektronen. Um die Effektivität der Radikale, die mit Ribonuclease reagieren können, beim Abbau von Methionin, Tyrosin, Histidin und Lysin abzuschätzen, wurde nun in ähnlicher Weise wie bei der Inaktivierung (s. Seite 56) nach dem Verfahren von Mee, Adelstein und Stein vorgegangen.

In die Gleichung

$$G_{\text{-AS}} = \sum g_i f_i \quad (45)$$

wurden die G-Werte für den Abbau einer Aminosäure und g_i -Werte der Radikale, wie sie in der Tabelle 6 zusammengestellt sind, eingesetzt. Die g_i -Werte wurden wie bei der Strahleninaktivierung nur aufgrund der Gleichungen für kompetetierende Reaktionen von Ribonuclease und Fängersubstanzen errechnet. Bei dieser Abschätzung wurde also nicht ein Abfangen der $\text{OH}^\bullet$ -Radikale durch Verunreinigungen berücksichtigt, wie es sich nach den Berechnungen unter 3.8 ergab. Daher können die so erhaltenen Werte für die Effektivität der Primärradikale für den Abbau der Aminosäuren nur für das verwendete Puffersystem gelten.

Da jeweils der G-Wert für die Zerstörung der einzelnen Aminosäuren unter 6 verschiedenen Bedingungen gemessen wurde, können 6 Gleichungen für die Ermittlung der 4 unbekannten f_i , die Werte für die Effektivität der Radikale für den Aminosäureabbau, aufgestellt werden. Dieses derart überbestimmte lineare Gleichungssystem kann nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate näherungsweise gelöst werden:

$$G_{\text{-AS},k} = \sum_{i=1}^4 g_{ki} f_i \quad \text{für } k = 1, \dots, 6$$

Bestrahlungsbedingungen	G-Werte für Zerstörung von					G - Werte für			
	Met	Tyr	His	Lys	OH [•]	H [•]	e _{aq} ⁻	Aeth	
N ₂	0,129	0,300	0,065	0,088	2,70	0,58	2,65	0	
N ₂ + 10 ⁻² M C ₂ H ₅ OH	0,112	0,202	0,082	0,147	0,67	0,54	2,65	2,07	
N ₂ O	0,112	0,247	0,118	0,176	5,35	0,58	0	0	
N ₂ O + 10 ⁻² M C ₂ H ₅ OH	0,100	0,185	0,176	0,176	1,34	0,54	0	4,05	
N ₂ + 10 ⁻¹ M C ₂ H ₅ OH	0,065	0,168	0,088	0,029	0,05	0,28	2,65	2,95	
N ₂ O + 10 ⁻¹ M C ₂ H ₅ OH	0,047	0,088	0,223	0,118	0,11	0,28	0	5,54	

Tabelle 6

wird

$$F = \sum_{k=1}^6 \left(\sum_{i=1}^4 g_{k,i} f_i - G_{AS,k} \right)^2$$

gebildet. Dieser Fehlerausdruck wird im Idealfall, d.h. wenn alle 6. Gleichungen von denselben Werten f_i erfüllt werden, zu Null. Eine optimale Lösung für die f_i im Sinne der kleinsten Fehlerquadrate ergibt sich, wenn man

$$\frac{\partial F}{\partial f_i} = 0 \quad i = 1, \dots, 4$$

setzt. Man erhält dabei ein lineares Gleichungssystem für die f_i . Nach diesem Verfahren ließen sich die folgenden Werte für die Effektivität der Primärradikale beim Abbau der entsprechenden Aminosäuren berechnen:

AS	f_i für			
	OH $\cdot$	H $\cdot$	e $_{aq}^-$	Aeth
Met	0,00	0,19	0,01	0,00
Tyr	0,03	0,21	0,03	0,01
Lys	-0,01	0,35	-0,02	0,00
His	0,02	0,01	-0,01	0,04

Aus diesen Werten kann man schließen, daß Methionin und Lysin allein durch die Reaktion mit H $\cdot$ abgebaut werden. Auch beim Tyrosin ist die Effektivität der H $\cdot$ -Radikale im Abbau sehr viel größer als der OH $\cdot$ -Radikale und der solvatisierten Elektronen.

Bei Histidin findet man hingegen nicht die hohe Effektivität der H $\cdot$ -Radikale im Abbau. Hier kann die Zerstörung wahrscheinlich auch durch Reaktionen von OH $\cdot$ - und Aethanol-Radikale bedingt werden.

Das Ergebnis, daß die H $\cdot$ -Radikale mit hoher Spezifität die Methionin- und Tyrosinreste im Ribonuclease-Molekül angreifen und daß bereits wenige H $\cdot$ -Radikale genügen, um diese Ami-

nosäuren zu zerstören, wird durch experimentelle Befunde von Stein und Mitarbeitern bestätigt /55/, /56/. Diese Autoren ließen atomaren Wasserstoff auf eine Ribonuclease-Lösung einwirken und fanden einen starken Abbau bei Cystin, Methionin, Tyrosin und Phenylalanin, während alle anderen Aminosäuren unverändert blieben. Bedingt durch ihre Analyse-methode - die basischen Aminosäuren wurden in einem separatem Trennungsgang bestimmt, wobei Lysin als Bezugsaminosäure genommen wurde - konnte ein Abbau von Lysin nicht gemessen werden. In den in dieser Arbeit vorgelegten Analysen ist der Abbau von Phenylalanin sehr gering, möglicherweise weil Phenylalanin ein Abbauprodukt des Tyrosins ist.

Der Befund, daß vor allem $H^{\cdot}$ -Radikale den Abbau von Aminosäureresten im Ribonuclease-Molekül bedingen, wurde bereits in einer früheren Arbeit /57/ vermutet. Bei dieser Untersuchung wurde die Aminosäurezusammensetzung von Ribonuclease bestimmt, die als trockene Substanz bestrahlt worden war. Die Aminosäureanalysen ergaben, daß bei direkter Strahleneinwirkung die gleichen Aminosäuren abgebaut werden wie bei Bestrahlung von Ribonuclease-Lösungen. Dieses Resultat führte zu der Hypothese, daß durch Absorption von Strahlung in der trockenen Ribonuclease statistisch über das Molekül verteilt H -Atome ausgelöst werden, die dann sehr spezifisch bestimmte Aminosäuren abbauen.

Es scheint somit sehr wahrscheinlich, daß der Abbau von Methionin, Tyrosin und Lysin durch $H^{\cdot}$ -Radikale bewirkt wird. Andererseits zeigte sich bei der Gegenüberstellung von G-Werten für die Inaktivierung und den vorhandenen Radikalen, die mit Ribonuclease reagieren können, daß H -Radikale nicht zur Inaktivierung beitragen. Daraus müßte dann folgen, daß es keine Korrelation zwischen der Inaktivierung und dem Abbau von Methionin, Tyrosin und Lysin gibt. In Tabelle 7 sind die G-Werte für die Inaktivierung der Hydrolase mit den G-Werten für den Abbau der Aminosäuren zusammengestellt. Die Werte für die Inaktivierung steigen von oben nach unten an. Bei keiner Aminosäure steigt der G-Wert für den Abbau entsprechend an. Auch beim

G (Inaktivierung) für Hydrolase	G-Werte für den Abbau von				Bestrahlungs- bedingungen
	Met	Tyr	Lys	His	
0,157	0,112	0,202	0,147	0,082	$N_2 + 10^{-2}M$ Aethanol
0,176	0,047	0,088	0,118	0,223	$N_2O + 10^{-1}M$ Aethanol
0,183	0,065	0,345	0,029	0,088	$N_2 + 10^{-1}M$ Aethanol
0,212	0,112	0,247	0,176	0,118	N_2O
0,239	0,129	0,300	0,088	0,065	N_2

Tabelle 7: G-Werte für Inaktivierung und Abbau von Aminosäureresten.

Histidin, das zwar nicht vom $H^{\bullet}$ -Radikal spezifisch angegriffen wird, läßt sich kein Zusammenhang zwischen Abbau und Verlust der Aktivität erkennen. Nach diesen Ergebnissen kann man annehmen, daß bei der Radiolyse die Zerstörung bestimmter Aminosäurereste nicht die chemische Veränderung am Ribonuclease-Molekül ist, die ausschlaggebend für die Inaktivierung des Enzyms ist.

Zu dem gleichen Schluß führten auch unsere früheren Untersuchungen an Ribonuclease /15/. Dabei war bestrahlte Ribonuclease durch Gelfiltration in 2 Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße aufgetrennt worden. Die eine Fraktion enthielt Ribonuclease-Moleküle, die sich in ihrer Größe nicht von nativen Ribonuclease-Molekülen unterschieden und noch sehr starke enzymatische Aktivität aufwiesen, während die andere Fraktion mehr als doppelt so große Moleküle enthielt, die aber enzymatisch inaktiv waren. Die Aminosäureanalyse ergab für die inaktive wie auch für die aktive Fraktion den gleichen Abbau bei bestimmten Aminosäuren. Daraus ergab sich als Schlußfolgerung, daß bei der Radiolyse der Verlust einzelner Aminosäuren nicht der Grund für den Verlust der enzymatischen Aktivität sein kann. In jener Arbeit wurde vor allem nachgewiesen, daß die Strahleninaktivierung nicht auf der Zerstörung von Cystin beruht.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit /58/ weisen Lynn und Skinner nach, daß bei der Strahleninaktivierung der alkalischen Phosphatase ebenfalls kein Zusammenhang besteht zwischen dem Abbau von Aminosäuren und der Inaktivierung des Enzyms.

Auch Untersuchungen der Radiolyse von LDH /59/ unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen mit Hilfe der Aminosäureanalyse führen zu diesem Schluß.

3.10 Über die Aggregation der Ribonuclease durch Radiolyse

Bei der Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf eine wäßrige Proteinlösung findet man sehr häufig - wie auch bei anderen Denaturierungsprozessen - eine Vergrößerung der Proteinmoleküle. Diese durch Strahleneinwirkung so veränderten Moleküle lassen sich durch Säulenchromatographie über Dextran-gele abtrennen.

Zum besseren Verständnis der folgenden Meßergebnisse soll zunächst das Prinzip der Gelchromatographie erläutert werden. Das für die Chromatographiesäule verwendete Dextrangel hat jeweils bestimmte Porengrößen, die entsprechend der Molekülgröße der zu trennenden Proteine gewählt wird. Die Wahl soll so erfolgen, daß die kleinen Moleküle in die Poren der Gelkörper eindringen können und ihnen sowohl die flüssige als auch der größte Teil der festen Phase zugänglich ist. Je größer die Moleküle werden, desto kleiner wird der Anteil der festen Phase, in die die Moleküle eindringen können und schließlich steht ihnen nur noch die mobile Phase zur Verfügung. Diese Moleküle müssen während des Chromatographievorganges ein kleineres Volumen durchlaufen - nur das sogenannte Ausschlußvolumen V_0 - als die kleineren Moleküle, die auch einen Teil der festen Phase durchwandern müssen. Daher werden immer die größeren vor den kleineren Molekülen eluiert (s. Abb. 13).

Chromatographiert man native Ribonuclease über das Dextrangel Sephadex G-75 bei den in Abschnitt 2.5 beschriebenen Bedingungen, so erscheint sie als einheitlicher Peak mit einem Maximum der Proteinkonzentration in Fraktion 78. Bestrahlt man Ribonuclease in einer Konzentration von 1 mg/ml in 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer unter N_2 mit 80 krd und chromatographiert unter gleichen Bedingungen, so beginnt die Elution bereits bei Fraktion 31 und etwa die Hälfte der aufgetragenen Ribonuclease-Menge wird in Fraktionen vor dem nativen Enzym eluiert (siehe Abb. 14). Bei Steigerung der Dosis auf 120 und 160 krd nimmt der Anteil der vergrößerten Moleküle, die mit einem Maximum in Fraktion 33

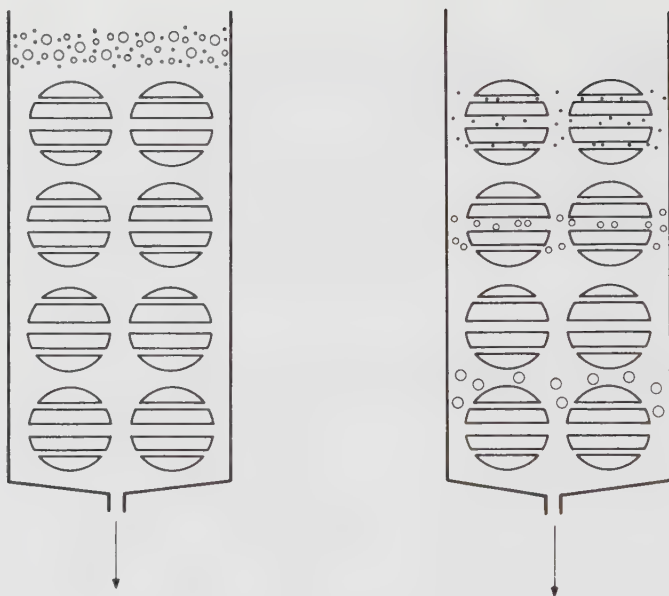


Abb. 13: Schematische Darstellung für die Auftrennung verschieden großer Moleküle über Dextransgele.

eluiert werden, zu und der Anteil Protein, dessen Molekülgröße sich nicht von der nativen Ribonuclease unterscheidet, nimmt ab. Bei 160 krd betrug die Restaktivität noch 45 % und der größte Anteil des Proteins wird im Ausschlußvolumen der Säule eluiert. Durch die Radiolyse haben sich die Moleküle so vergrößert, daß sie nicht mehr in die Poren des Gels eindringen können. In früheren Untersuchungen /57/ konnte gezeigt werden, daß diese Vergrößerung durch die Aggregation entfalteter Moleküle bedingt ist. Wie in Abb. 14 gezeigt wurde, steigt also der Anteil der aggregierten Proteinmoleküle mit der Dosis und dem Inaktivierungsgrad an, wenn Ribonuclease in konstanter Konzentration bestrahlt wird.

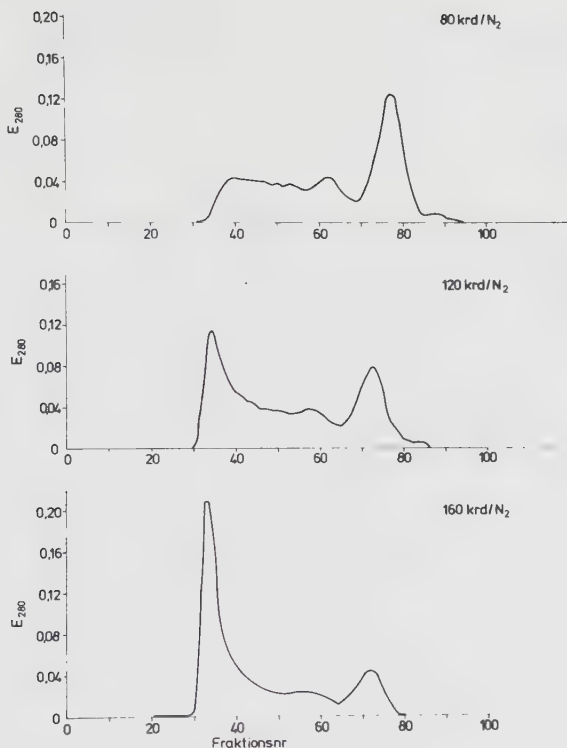


Abb. 14: Auftrennungen über Sephadex G-75 von Ribonuclease, die in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer gelöst bei N₂-Sättigung mit verschiedenen Dosen bestrahlt worden war.

Ändert man die Enzymkonzentration und bestrahlt man mit konstanter Dosis, so nimmt auch der Anteil der aggregierten Moleküle mit steigender Inaktivierung zu (Abb. 15). Bei einer Ribonuclease-Konzentration von 0,5 mg/ml erreicht man unter den genannten Bedingungen mit einer Dosis von 120 krd unter diesen Bedingungen eine Inaktivierung bis auf 34 % Restaktivität. Dabei liegt die Ribonuclease fast nur noch in der aggregierten

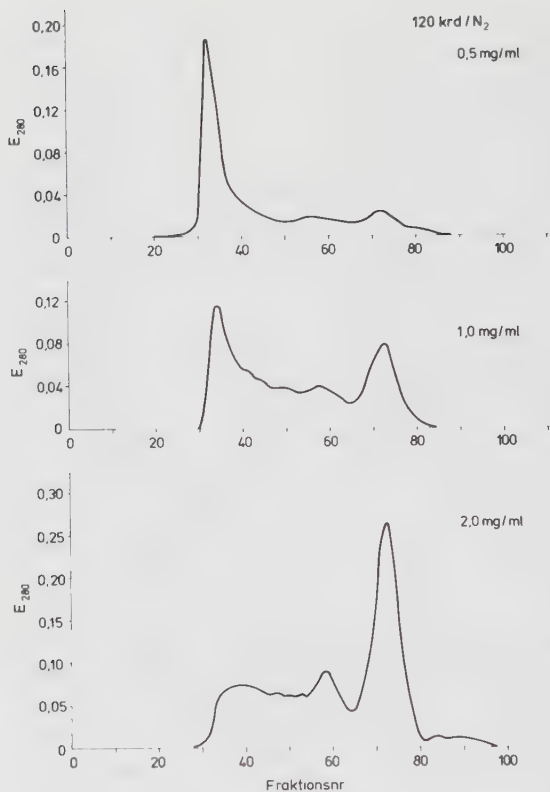


Abb. 15: Auftrennungen über Sephadex G-75 von Ribonuclease, die in verschiedenen Konzentrationen in 0,01 M Phosphatpuffer gelöst bei N₂-Sättigung mit 120 krd bestrahlt worden war.

Form vor. Bei vierfach höherer Konzentration ist nach einer Dosis von 120 krd die Restaktivität noch 70 % und gleichzeitig hat der größte Teil der Enzymmoleküle noch seine ursprüngliche Größe beibehalten. Aufgrund von diesen und anderen /16/ Versuchsergebnissen konnte man zunächst annehmen, daß zwischen Inaktivierung und Aggregation eine Korrelation besteht.

In Fortsetzung dieser Arbeiten wurde nun untersucht, welchen Einfluß hat die Zusammensetzung der Primärradikale auf die Aggregation. Es wurde daher wie in den vorangegangenen Abschnitten durch die Wahl der Bestrahlungsbedingungen die Mengenverhältnisse der einzelnen reagierenden Radikale geändert, so daß man möglicherweise ihre Beteiligung am Aggregationsprozeß erkennen kann.

Bestrahlt man die Ribonuclease-Lösung nicht unter N_2 , sondern unter N_2O , so überführt man die hydratisierten Elektronen in $OH^{\bullet}$ -Radikale (s. Gleichung 18) und kann deren Wirkung auf den Aggregationsprozeß beobachten. Mit steigender Dosis findet man auch unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Aggregation (s. Abb. 16). Auch wenn die Enzymkonzentration variiert wird, nimmt die Aggregation mit dem Inaktivierungsgrad zu (Abb. 17). Vergleicht man aber die Ergebnisse der Gelchromatographie unter den beiden verschiedenen Gasbedingungen, so stellt man fest, daß bei gleichem Inaktivierungsgrad unter N_2O das Protein stets zu einem größeren Teil aggregiert ist als unter N_2 . Dieses Ergebnis wird auch durch Untersuchungen von Mee, Adelstein und Stein /50/ bestätigt. Da in Gegenwart von N_2O der Anteil der OH -Radikale erhöht ist, kann man annehmen, daß die $OH^{\bullet}$ -Radikale die Reaktionen auslösen, die zur Aggregation führen.

Fängt man die $OH^{\bullet}$ -Radikale durch Zusatz von 10^{-1} Äthanol ab, so scheint sich diese Annahme zunächst zu bestätigen (Abb. 18). Nach Bestrahlung mit 160 krd unter N_2 und unter Zusatz von 10^{-1} M Äthanol ist die Ribonuclease um 47 % inaktiviert, aber die Ribonuclease-Moleküle behalten weitgehend ihre ursprüngliche Größe. Führt man die Bestrahlung unter N_2O und unter Zusatz von 10^{-1} M Äthanol durch, so gibt es keine Veränderung verglichen mit dem Chromatogramm der nativen Ribonuclease.

Bei der Verwendung von Äthanol zum Abfangen der OH -Radikale reduziert man aber nicht nur die Anzahl der OH -Radikale, sondern man erzeugt auch gleichzeitig Äthanolradikale, von denen man aufgrund unserer Inaktivierungsstudien erwarten muß, daß sie mit Ribonuclease reagieren. Nimmt man an, daß die Aggregate

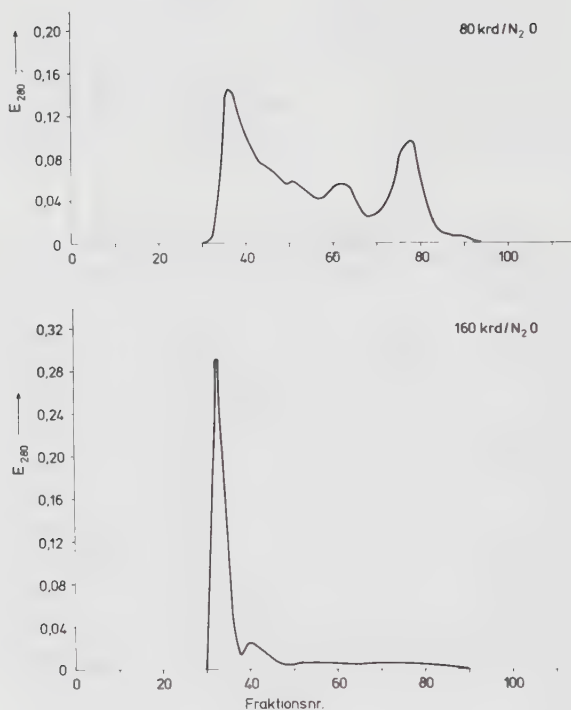
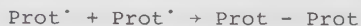


Abb. 16: Auftrennungen über Sephadex G-75 von Ribonuclease, die in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer gelöst bei N₂O-Sättigung mit 80 und 160 krd bestrahlt worden war.

durch Reaktion der Proteinradikale gebildet werden, so besteht die Möglichkeit, daß an Stelle der Reaktion



in Gegenwart von Aethanolradikalen die Reaktion

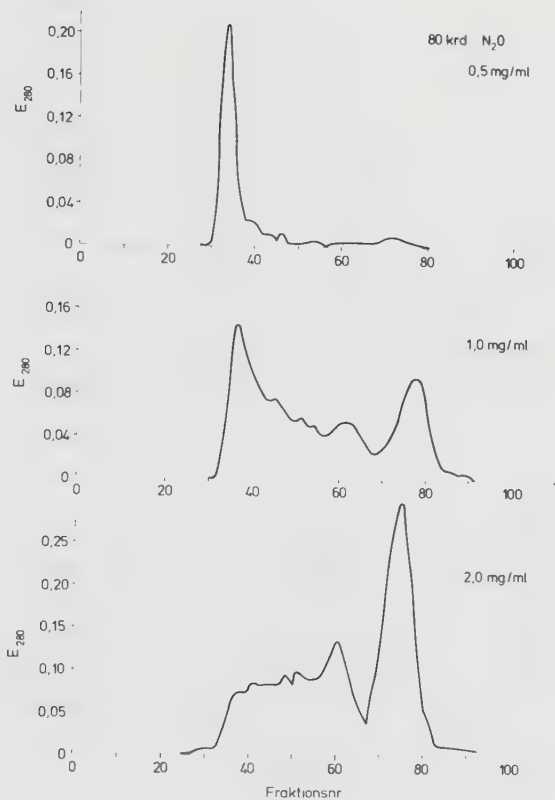
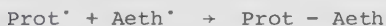


Abb. 17: Auftrennungen über Sephadex G-75 von Ribonuclease, die in verschiedenen Konzentrationen in 0,01 M Phosphatpuffer gelöst bei N₂O-Sättigung mit 80 krd bestrahlt worden war.



tritt und die Aggregation verhindert.

Ein experimenteller Beweis dafür, daß diese Reaktionen stattfindet, ist unter Verwendung von ¹⁴C-markiertem Aethanol bei dem Bestrahlungsversuch und durch anschließende Gelfiltration möglich.

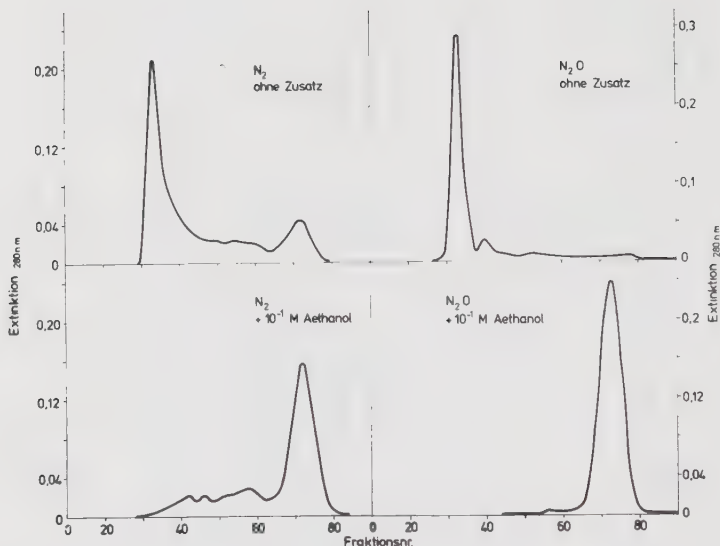


Abb. 18: Auftrennungen über Sephadex G-75 von Ribonuclease, die in einer Konzentration von 1 mg/ml unter den angegebenen Bedingungen mit 160 krd bestrahlt worden war.

3.11 Nachweis der Reaktion der Aethanolradikale mit Ribonuclease

Ribonuclease wurde unter N_2O mit 10^{-1} M Aethanol, dem weniger als 1 % ^{14}C -markiertes Aethanol zugemischt war, mit 400 krd bestrahlt und anschließend über Sephadex G-75 superfine aufgetrennt. Da für diese Versuche eine kleinere Säule benutzt wurde als bei den vorhergehenden Versuchen, wurde die native Ribonuclease mit einem maximalen Proteingehalt bereits in Fraktion 60 eluiert. Nach der Bestrahlung mit 400 krd wird das bestrahlte Enzym wieder in der gleichen Position wie das native Enzym eluiert. Nur etwa 5% des Proteins liegen in Form von vergrößerten

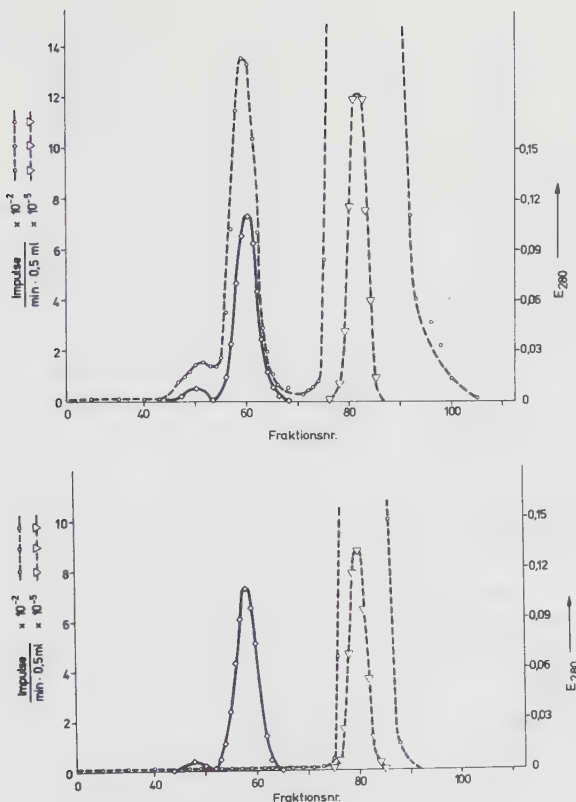


Abb. 19: Auftrennung über Sephadex G-75 von einer Ribonuclease-Lösung, die mit 400 krd unter N₂O bestrahlt worden war. Die Ribonuclease war in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer gelöst, dem 10⁻¹ Aethanol zugesetzt worden war.

Molekülen vor (s. Abb. 19). Der ¹⁴C-Gehalt wurde mit Hilfe von Flüssigkeitszintillationsmessung in den einzelnen Fraktionen festgestellt. Dabei zeigte sich, daß die Fraktionen 45 - 68 entsprechend ihrem Proteingehalt ¹⁴C enthielten. Deutlich davon abgetrennt findet man in den Fraktionen 75 - 85 das nicht umgesetzte Aethanol. Im Durchschnitt waren nach 400 krd unter

diesen Bedingungen an einem Ribonuclease-Molekül etwa 3,0 Aethanolreste gebunden. Dabei ist aber zu bemerken, daß in allen untersuchten Fällen das Verhältnis von Aethanol : Ribonuclease nicht in allen Fraktionen konstant war. Die Markierung war in den ersten Proteinfractionen stärker als bei den später eluierten Fraktionen. Um zu prüfen, ob das ^{14}C -markierte Aethanol nicht nur durch unspezifische Bindung an der Ribonuclease adsorbiert ist, wurde die gleiche Radiolyse noch einmal ohne ^{14}C -markiertes Aethanol durchgeführt. Erst nach der Bestrahlung wurde dann ^{14}C -markiertes Aethanol in der gleichen Menge wie beim vorher beschriebenen Versuch hinzugefügt und einige Zeit bei Zimmertemperatur belassen. Nach der Gelfiltration zeigte sich, daß die Proteinfractionen nun keine Radioaktivität aufwiesen (s. Abb. 19).

Dieser Versuch ergab also, daß das Aethanol an dem bestrahlten Enzym nicht unspezifisch adsorbiert ist, sondern daß während der Radiolyse das Aethanol an das Protein chemisch gebunden wird. Erniedrigt man die Dosis auf 200 krd, so erniedrigt sich auch die Menge Aethanol, die mit dem Protein reagiert hat (s. Abb. 20). Im Durchschnitt waren nach 200 krd unter N_2O ungefähr nur noch 2 Aethanolreste pro Ribonuclease gebunden. Führt man die gleiche Bestrahlung unter N_2 an Stelle von N_2O durch, so erniedrigt sich der G-Wert der Aethanolradikale von 5,54 auf 2,95. Die daher zu erwartende geringe Reaktion von Aethanolradikalen, ist deutlich meßbar (s. Abb. 20). Das durchschnittliche Verhältnis von Aethanol : Ribonuclease ist von 2,1 auf 1,3 erniedrigt.

Aufgrund dieser Versuche kann nicht entschieden werden, ob zwischen Aethanol und Ribonuclease nur Radikal-Radikal - oder nur Radikal-Molekülreaktionen oder beide Arten von Reaktionen ablaufen. Sicher ist hingegen aufgrund dieser Versuchsergebnisse, daß bei der Radiolyse die Fängerradikale mit der Ribonuclease reagieren. Dieses Versuchsergebnis bestätigt unsere Annahme aufgrund der Inaktivierungsversuche, daß Aethanolradikale mit Ribonuclease reagieren.

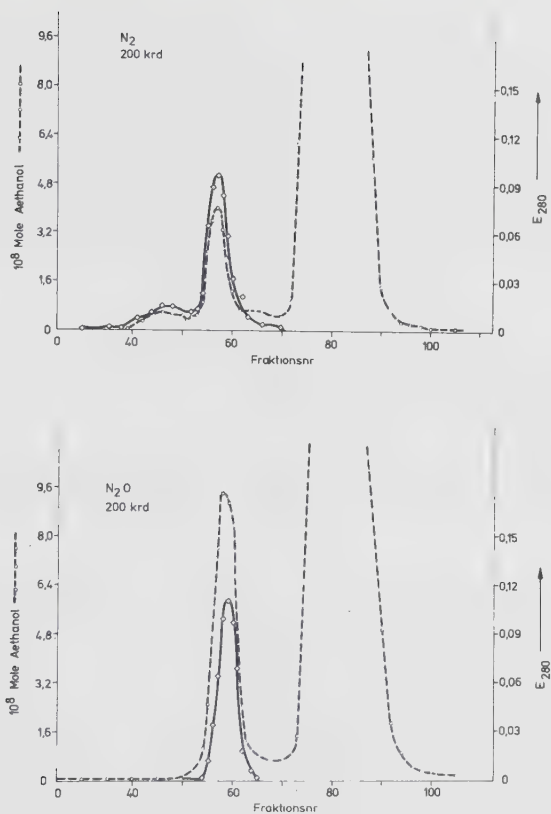


Abb. 20: Auftrennung über Sephadex G-75 von einer Ribonuclease-Lösung, die mit 200 krd bestrahlt worden war. Die Ribonuclease war in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer gelöst, dem 10⁻¹M Aethanol zugesetzt worden war.

Oberer Teil der Abb.: nach Bestrahlung bei N₂-Sättigung.

Unterer Teil der Abb.: nach Bestrahlung unter N₂O-Sättigung.

4. Diskussion

Die hier vorgelegten Untersuchungen haben Ergebnisse geliefert, die zur Klärung des Reaktionsmechanismus der Strahleninaktivierung von Enzymen beitragen. Da eine Vielzahl von Arbeiten sich mit ähnlichen Problemen bei der Strahleninaktivierung beschäftigen und zu unterschiedlichen Deutungen des Mechanismus kommen, sollen in diesem Teil der Arbeit die Resultate der verschiedenen Autoren dargestellt und diskutiert werden.

4.1 Effektivität der Radikale bei der Inaktivierung von Ribonuclease

Eine sehr umstrittene Frage ist, welche Radikale mit dem Enzym reagieren und in welchem Maße sie dabei zur Inaktivierung beitragen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sowohl $\text{OH}^\bullet$ -Radikale als auch hydratisierte Elektronen zur Inaktivierung der Ribonuclease beitragen, während sich in dem hier untersuchten System keine Effektivität des $\text{H}^\bullet$ -Radikals für die Inaktivierung nachweisen ließ. Ein sehr wichtiges Resultat dieser Arbeit ist der Nachweis, daß die Fängerradikale - im vorliegenden Fall Aethanolradikale - mit dem Enzym reagieren und auch zur Inaktivierung beitragen. Diese Ergebnisse wurden erhalten aus Messungen mit verschiedenen Enzymkonzentrationen. Dadurch konnte auch gezeigt werden, daß beim Abfangen der Elektronen durch N_2O die gemessene Wirkung - Strahlenschutz oder Strahlensensibilisierung - von der Enzymkonzentration abhängt.

Eine der ersten Arbeiten, die sich mit der Frage nach den inaktivierenden Radikalen bei Ribonuclease beschäftigt, ist 1967 von Brustad /60/ veröffentlicht worden. Bei dieser Untersuchung wurde die Radiolyse des Enzyms in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Citrat- und Phosphatpuffer im pH-Bereich von 2,5 - 11 unter O_2 , N_2O und N_2 durchgeführt, unter O_2 wurden im gesamten

pH-Bereich gleichbleibend hohe Dosen für die Inaktivierung benötigt. Brustad nimmt an, daß ein Strahlenschutz durch Fängerwirkung des O_2 für hydratisierte Elektronen und $H^\bullet$ -Radikale bewirkt wird (s. Gl. 17) und daß die entstehenden Peroxyradikale Ribonuclease nicht inaktivieren. Die geringe unter O_2 erfolgende Inaktivierung wird den $OH^\bullet$ -Radikalen zugeschrieben. Unter N_2 und unter N_2O steigt die Strahlenempfindlichkeit der Ribonuclease mit fallendem pH-Wert stark an. Dabei werden unter N_2 sehr viel niedrigere Werte für die D_{37} gemessen als unter N_2O . Nach Brustad wirkt sich das Abfangen der hydratisierten Elektronen durch N_2O als Strahlenschutz aus, so daß bei pH 4 die Inaktivierung im wesentlichen der Reaktion der hydratisierten Elektronen zugeschrieben wird. Erst bei weiterer Erniedrigung soll die Wirksamkeit der H -Radikale zunehmen. Ein Grund für die stärkere Strahlenempfindlichkeit im sauren Gebiet soll die Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion des hydratisierten Elektrons mit Ribonuclease sein, wie sie von Braams /32/ gemessen wurde.

Ähnliche Versuchsbedingungen wie Brustad wenden auch Mee, Adelstein und Stein /50/ bei ihren Untersuchungen über die Effektivität der Radikale bei der Inaktivierung der Ribonuclease an. Sie messen auch die Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom pH-Wert der Enzymlösung. Das Enzym wurde dazu in einer Konzentration von 1 mg/ml in Phosphatpuffer unter N_2 und N_2O und zum Teil unter Zusatz von t-Butanol bestrahlt. Sie finden wie Brustad im sauren pH-Gebiet einen starken Anstieg der Strahlenempfindlichkeit, nehmen aber eine andere Ursache für dieses Verhalten an. Mit Erhöhung der H^+ -Ionen-Konzentration nimmt der Teil der Elektronen, der in $H^\bullet$ -Radikale überführt wird, zu (s. Gl. 13), wodurch bei gleichbleibendem G-Wert der $OH^\bullet$ -Radikale der G-Wert der $H^\bullet$ -Radikale ansteigt. Nach Mee, Adelstein und Stein ist die Zunahme der Strahleninaktivierung im sauren pH-Bereich bedingt durch die Erhöhung der strahlenchemischen Ausbeute an $H^\bullet$ -Radikalen. Aus ihren Messungen berechnen sie nach dem im Abschnitt 3.7 beschriebenen Verfahren folgende Faktoren für die Wirksamkeit der Primärradikale bei der Inaktivierung der Ribonuclease:

$$f_{\text{OH}\cdot} = 0,07 \quad f_{\text{H}\cdot} = 0,25 \quad f_{\text{e}^{-}\text{aq}} = 0,06$$

Danach wäre also die Wirksamkeit der $\text{H}\cdot$ -Radikale etwa viermal höher als die der anderen Radikale.

Der beobachtete Anstieg der Strahlenempfindlichkeit im sauren Gebiet kann also auf zwei Gründe zurückgeführt werden:

Erstens auf die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit der Elektronen und zweitens auf die Erhöhung der Ausbeute an $\text{H}\cdot$ -Radikalen. Beide Effekte werden durch Erhöhung der H^{+} -Ionen-Konzentration bewirkt und sollten bei der Interpretation der Messungen im sauren pH-Bereich berücksichtigt werden. Ein weiterer Effekt, der durch die pH-Änderung hervorgerufen wird, wird aber in beiden Arbeiten nicht berücksichtigt. Es wird nämlich vernachlässigt, daß unter sauren Bedingungen die Ribonuclease in einem anderen Zustand vorliegt als im neutralen Medium. Hermans und Scheraga /61/ haben nachgewiesen, daß im sauren pH-Bereich ein bedeutend geringerer Energieaufwand als im neutralen pH-Bereich notwendig ist, um die Ribonuclease in den denaturierten Zustand zu überführen. Folglich müssen im sauren Gebiet weniger Bindungen (z.B. H-Brücken und elektrostatische Wechselwirkung) zur Stabilisierung der Struktur vorliegen als im neutralen Gebiet, und die Ribonuclease ist daher bereits in einem quasi-prä-denaturierten Zustand, in dem die Inaktivierung schon nach wenigen Radikalreaktionen erfolgen kann. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die schwächere Struktur im sauren Medium im wesentlichen zur erhöhten Strahlenempfindlichkeit beiträgt, und die verstärkte Inaktivierung sowohl durch den erhöhten G-Wert der $\text{H}\cdot$ -Radikale wie auch durch die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit der solvatisierten Elektronen wird sich davon nur schwer abgrenzen lassen.

Ein weiterer Einwand gegen die Arbeit von Mee, Adelstein und Stein ist, daß beim Abfangen der $\text{OH}\cdot$ -Radikale durch t-Butanol (s. Gleichung 21) nicht die Möglichkeit von Reaktionen der t-Butanolradikale berücksichtigt wird, obgleich die Meßwerte dieser Arbeit eine solche Reaktion vermuten lassen. So nimmt

z.B. bei Messungen bei pH 7,5 der G-Wert für die Inaktivierung mit Steigerung der Konzentration des t-Butanols von 0,025 M auf 0,25 M zu. Auch ihre Ergebnisse bei der Gelfiltration (siehe Seite 99) von Ribonuclease, die in Gegenwart von t-Butanol bestrahlt wurde, lassen eine Reaktion von t-Butanol-Radikalen möglich erscheinen.

Adams und Mitarbeiter /48/ untersuchten ebenfalls die Strahleninaktivierung von Ribonuclease in Gegenwart von Fängersubstanzen, um Aussagen über die inaktivierende Wirkung der einzelnen Wasserradikale machen zu können. Diese Autoren finden, daß mit steigender Konzentration von t-Butanol, das als OH'-Fänger dient, die Strahlenempfindlichkeit der Ribonuclease abnimmt und zwar beträgt sie noch 10 % des ursprünglichen Wertes, wenn die OH'-Fänger-Konzentration auf $10^{-2}M$ angestiegen ist. Weiterer Zusatz von t-Butanol erhöht den Strahlenschutz nicht mehr. Führt man die Bestrahlung in Gegenwart von $10^{-2}M$ t-Butanol nicht unter N_2 sondern unter N_2O durch, so wird die Strahlenempfindlichkeit nicht weiter herabgesetzt, d.h. das zusätzliche Abfangen der solvatisierten Elektronen hat keine Wirkung. Andererseits finden diese Autoren auch nach Bestrahlung unter N_2O ohne Zusatz von t-Butanol - also unter Bedingungen, bei denen alle solvatisierten Elektronen in OH'-Radikale überführt worden sind - eine Verdopplung des G-Wertes für die Inaktivierung, was für die stark inaktivierende Wirkung der OH'-Radikale spricht. Alle diese Messungen wurden an Ribonuclease-Lösungen der Konzentration von 0,06 mg/ml = $4,4 \cdot 10^{-6}M$ durchgeführt. Aus diesen Untersuchungen wird der Schluß gezogen, daß die Strahleninaktivierung der Ribonuclease zu 90 % durch OH'-Radikale und zu 10 % durch H'-Radikale hervorgerufen wird, während die solvatisierten Elektronen nicht zur Inaktivierung beitragen.

Die von Adams und Mitarbeitern angegebenen Meßergebnisse lassen sich nicht mit den von anderen Autoren angegebenen Meßwerten vereinbaren. Das betrifft sowohl die Angaben über die Schutzwirkung des t-Butanols als auch über die erhöhte Strahlenempfindlichkeit der Ribonuclease unter N_2O . Nach Adams soll

durch das Abfangen der OH-Radikale durch t-Butanol der G-Wert für die Inaktivierung auf 10 % reduziert werden. Wir finden beim Abfangen der OH⁻-Radikale durch 10⁻²M Aethanol eine Reduzierung auf 60 % des G-Wertes, den wir ohne Abfangen der Primärradikale gemessen haben. Auch von Mee u.a. wird eine Schutzwirkung in dieser Größenordnung gefunden.

Adams und Mitarbeiter finden bei ihren Versuchen eine Verdoppelung der Strahlenempfindlichkeit der Ribonuclease durch N₂O, während Mee u.a. im gleichen pH-Bereich bei einer Ribonuclease-Konzentration von 1mg/ml nur eine Strahlensensibilisierung der Ribonuclease durch N₂O um etwa 10 % finden und von Brustad bei einer Ribonuclease-Konzentration von 0,1 mg/ml durch die gleiche Substanz ein Strahlenschutz gemessen wird. In diesen Fällen war die Wirkung von N₂O nur jeweils bei einer Enzymkonzentration nachgewiesen worden. Die hier vorgelegten Messungen (Abb. 3 und Tabelle 1) zeigen, daß die gemessene Wirkung des N₂O von der Enzymkonzentration abhängt. So erhält man bei niedrigen Ribonuclease-Konzentrationen durch N₂O einen Strahlenschutz und bei höheren Enzymkonzentrationen eine Strahlensensibilisierung. Die Meßergebnisse von Mee und Brustad sind daher mit unseren Messungen zu vereinbaren. Dagegen läßt sich mit diesem Ergebnis nicht erklären, wieso Adams und Mitarbeiter bei der von ihnen verwendeten sehr niedrigen Enzymkonzentration von 0,06 mg/ml eine Strahlensensibilisierung finden. Es ist zu befürchten, daß bei sehr niedrigen Enzymkonzentrationen sehr viel leichter Denaturierungen auftreten und daß bei den kompetitiven Reaktionen (s. Gleichung 44) die Reaktionen mit Verunreinigungen der Lösung bestimmend werden.*

In letzter Zeit wurden Untersuchungen ähnlicher Art auch an anderen Enzymen durchgeführt. Dabei wurde auch durch die Verwendung von Fängersubstanzen versucht, die inaktivierende Wirkung der Primärradikale festzustellen.

* Im Jahresbericht der Gray Laboratories von 1974 wird angegeben, daß von Adams und Mitarbeitern bei einer Wiederholung der Messungen weder der starke Schutzeffekt von t-Butanol noch die Strahlensensibilisierung durch N₂O festgestellt werden konnten.

Bei der Untersuchung der Strahleninaktivierung von Papain, die von 3 verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt wurde, wurde - ähnlich wie bei der Ribonuclease - unterschiedliche Wirkung bei der Verwendung von N_2O festgestellt. So finden Adams und Redparth /62/, daß der G-Wert für die Inaktivierung, den sie bei Bestrahlung von Papain unter N_2 messen, durch Sättigung der Enzymlösung mit N_2O verdoppelt wird. Dagegen finden Lynn und Louis /63/ gleiche G-Werte für die Inaktivierung von Papain unter N_2 und N_2O und Gaucher u.a. /64/ beschreibt einen Strahlenschutz für Papain durch das Abfangen der Elektronen durch N_2O . Auch diese Untersuchungen wurden wieder nur jeweils mit einer bestimmten Enzymkonzentration durchgeführt. Daher kann man vermuten, daß es sich um eine ähnliche Abhängigkeit der Wirkung des N_2O von der Enzymkonzentration handelt, wie sie in dieser Arbeit für Ribonuclease beschrieben wird.

Die Bedeutung der Primärradikale für die Inaktivierung bei den verschiedenen untersuchten Enzymen wird unterschiedlich beurteilt. So wird von Adams und Mitarbeitern /47/ gefunden, daß Lysozym im wesentlichen durch Reaktionen der $OH^\bullet$ -Radikale inaktiviert wird. Ebenfalls soll die Strahleninaktivierung von Carboxypeptidase im neutralen Gebiet durch $OH^\bullet$ -Radikale erfolgen /65/. Die hydratisierten Elektronen hingegen sollen die Inaktivierung von Trypsin /66/ und von α -Chymotrypsin /67/ bewirken. Eine hohe Effektivität der $H^\bullet$ -Radikale bei der Inaktivierung von Alkoholdehydrogenase wurde von Badiello u.a. /68/ beschrieben.

Bei den bis jetzt veröffentlichten Untersuchungen über die Strahleninaktivierung von Enzymen wurde der Effekt des Abfangens bzw. des Verdoppelns von Primärradikalen jeweils bei einer konstanten Enzymkonzentration gemessen, was zu Fehlinterpretationen führen kann, wie gezeigt wurde. Auch bei Variierung des G-Wertes für $H^\bullet$ -Radikale durch pH-Verschiebung, wie sie in einigen dieser Arbeiten vorgenommen wird, darf die erhöhte Strahlenempfindlichkeit des Enzyms im sauren pH-Bereich nicht ausschließlich auf die Erhöhung der strahlenchemischen Ausbeute der $H^\bullet$ -Radikale zurückgeführt werden, wie es in der Diskussion über

die Arbeiten an Ribonuclease von Brustad und Mee gezeigt wurde. Bei den hier erwähnten Arbeiten wurde zum Abfangen der $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale t-Butanol verwendet. In keinem Fall wurde jedoch angenommen, daß t-Butanolradikale mit dem Enzym reagieren und es dabei inaktivieren, obgleich einige Meßergebnisse für diese Annahme sprechen. So wurden sowohl bei Carboxypeptidas /65/ als auch bei Alkoholdehydrogenase /68/ im neutralen pH-Bereich nach Bestrahlung in Gegenwart von t-Butanol und N_2O relativ hohe G-Werte für die Inaktivierung gemessen. Unter diesen Bedingungen beträgt der G-Wert für die $\text{H}^{\bullet}$ -Radikale nur 0,5, während der G-Wert für t-Butanol-Radikale etwa 5,6 ist. Trotzdem wird die Inaktivierung ausschließlich den Reaktionen der H-Radikale zugeschrieben. In der 1974 veröffentlichten Arbeit über die Strahleninaktivierung von Papain beschreiben Adams und Redpath /62/, daß bei Bestrahlung unter N_2O mit Erhöhung der Konzentration von t-Butanol gegen ihre Erwartung die Inaktivierung zunimmt. Dieses Meßergebnis läßt vermuten, daß auch t-Butanol-Radikale zur Inaktivierung beitragen. Da aber bei allen bisherigen Untersuchungen die Annahme gemacht worden war, daß t-Butanol-Radikale nicht mit Proteinen reagieren, müssen die Angaben über die Effektivität der Primärradikale bei der Inaktivierung nochmal daraufhin überprüft und wahrscheinlich korrigiert werden. Bei der Weiterführung dieser Arbeiten über die Wirksamkeit der Radikale bei der Inaktivierung von Enzymen, sollte stets auch untersucht werden, ob ein gemessener Effekt konzentrationsabhängig oder durch Wechselwirkung mit der Fängersubstanz oder auch durch andere Versuchsbedingungen, wie pH oder auch Ionenstärke, beeinflusst wird.

4.2 Strahleninduzierte Veränderungen von Molekül und ihre Korrelation zur Inaktivierung.

Zur Klärung des Mechanismus bei der Strahleninaktivierung von Enzymen tragen auch Untersuchungen über die strahleninduzierten Veränderungen am Proteinmolekül bei. In dieser Arbeit wurde zunächst als Veränderung in der Primärstruktur die Aminosäurezu-

sammensetzung der bestrahlten Ribonuclease-Proben überprüft. Dabei fand man, daß bei Bestrahlung unter unterschiedlichen Bedingungen die meisten Aminosäurereste im Protein sehr radio-lyseunempfindlich sind. Nur bei Cystin, Methionin, Tyrosin, Lysin und Histidin ließ sich ein merkbarer Abbau messen. Er betrug bei einer Dosis von 480 krd jeweils etwa 20 - 30 %. Aufgrund von unseren Messungen nach Bestrahlung unter N_2 , N_2O und in Gegenwart von Aethanol nehmen wir an, daß der Abbau von Methionin, Tyrosin und Lysin bevorzugt durch die Reaktionen mit den $H^{\bullet}$ -Radikalen, während der Abbau von Histidin wohl durch verschiedene Radikale erfolgt. Wegen des großen Fehlers bei der Cystinanalyse war für den Abbau von Cystin eine solche Zuordnung zu Reaktionen einer bestimmten Radikalsorte nicht möglich. Die Annahme, daß $H^{\bullet}$ -Radikale bevorzugt den Abbau von Aminosäureresten im Protein bewirken, ergab sich auch als Resultat aus zwei unserer früheren Arbeiten /15/, /57/. - Eine Korrelation zwischen dem Abbau einer Aminosäure und der Strahleninaktivierung der Ribonuclease war nicht feststellbar. Zum gleichen Ergebnis waren wir in einer früheren Arbeit /15/ gekommen, in der gleiche Aminosäurezusammensetzung bei Ribonuclease-Proben gefunden wurden, die nach Bestrahlung durch Gelfiltration aufgetrennt worden waren und unterschiedliche Enzymaktivität hatten.

Von Mee, Adelstein und Stein /50/ wurde ebenfalls der Abbau von Aminosäureresten bei bestrahlter Ribonuclease gemessen. Auch sie finden, daß bei Bestrahlung bei pH 7,5 sowohl unter N_2 wie unter N_2O , wie auch in Gegenwart von t-Butanol nur bei Cystin, Methionin und Tyrosin einen meßbaren Abbau. Da diese Autoren das Zweisäulenverfahren benutzen, bei dem die basischen Aminosäuren in einem separaten Trennungsvorgang mit Lysin als Bezugsamino-säure bestimmt werden, konnte von ihnen der Abbau von Lysin und Histidin nicht nachgewiesen werden. Wurde die Bestrahlung der Ribonuclease-Lösung statt bei pH 7,5 bei pH 2,5 durchgeführt, so war der Abbau von Cystin, Methionin und Tyrosin verstärkt. Für diese Messungen bei pH 2,5 wurden folgende G-Werte für den Abbau der Aminosäuren angegeben:

$$G\left(\frac{1}{2} \text{ Cys}\right) = 0,58, \quad G(\text{Met}) = 0,58, \quad G(\text{Tyr}) = 0,45.$$

Diese sehr hohen G-Werte für den Abbau von Methionin und Tyrosin bei Bestrahlung in saurer Lösung entsprechen auch unserer Annahme, daß der Abbau von Methionin und Tyrosin durch H[•]-Radikale bewirkt wird. Auch Mee, Adelstein und Stein nehmen an, daß H[•]-Radikale diese sehr spezifischen Reaktionen im Protein auslösen können, da nachgewiesen werden konnte, daß die Einwirkung von atomarem Wasserstoff auf Ribonuclease ebenfalls zur gleichen selektiven Zerstörung der schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren führt /55/, /56/. Aufgrund ihrer Ergebnisse und weiterer pulsradiolytischer Untersuchungen /43/ nehmen sie an, daß durch die Aufnahme eines H-Atoms durch Ribonuclease eine intramolekulare Kettenreaktion ausgelöst wird. Dabei soll der Angriff zuerst an den schwefelhaltigen und dann bei den aromatischen Aminosäuren erfolgen. Da diese Autoren bei der Untersuchung der Strahleninaktivierung der Ribonuclease zu der Auffassung gekommen waren, daß vor allem die Reaktionen der H-Radikale das Enzym inaktivieren, und da auch im sauren pH-Bereich die G-Werte für die Inaktivierung wie auch für den Abbau von Cystin, Methionin und Tyrosin ansteigen, nehmen sie eine Korrelation von Inaktivierung und dem Abbau einer dieser Aminosäuren an. Unsere Ergebnisse (Tabelle 7) hingegen zeigen, daß unter anderen Bedingungen diese Korrelation nicht besteht.

Von Adams und Mitarbeitern wurden zwar keine Aminosäureanalysen an bestrahlter Ribonuclease gemacht, aber aufgrund von pulsradiolytischen Untersuchungen werden von ihnen Aussagen über die erste Anlagerung der Primärradikale an Ribonuclease gemacht. Durch diese Reaktionen entstehen Radikalstellen am Protein, die nur in einem kurzen Übergangsstadium (100 - 1000 μ sec) vorhanden sind, bevor das Protein in eine stabile Modifikation übergeht. Diese Radikale zeigen charakteristische Übergangsspektren (transients), deren Absorptionsbanden bestimmten Radikalen zugeordnet werden können. Adams kann zeigen, daß der Angriff der Primärradikale zunächst bei den schwefelhaltigen, aromatischen und heterocyclischen Seitenketten der Ribonuclease erfolgt. Bei neutralem pH-Wert in Gegenwart von 10^{-1} M t-Butanol entsteht ein Übergangsspektrum mit einem Maximum bei etwa 400 nm, das

charakteristisch für die Anlagerung eines Elektrons an eine Disulfidgruppe ist. Werden die pulsradiolytischen Messungen an Ribonuclease unter N_2O durchgeführt, dann zeigt das Übergangsspektrum eine Absorption bei 330 nm. Diese Absorptionsbande entsteht durch Anlagerung von $OH^\bullet$ an aromatische oder heterocyclische Ringsysteme. Da sich bei der entsprechenden Messung unter N_2O und in Gegenwart von t-Butanol nur eine geringe Absorption in diesem Bereich zeigt, wird auch nur eine geringe Beteiligung von $H^\bullet$ -Radikalen an der Erzeugung dieser Absorptionsbande angenommen. Da Adams aufgrund seiner Untersuchungen über die Strahleninaktivierung zu dem Ergebnis gekommen war, daß 90 % der Inaktivierung durch Reaktionen der $OH^\bullet$ -Radikale bedingt ist, nimmt er nun auch an, daß es sich bei der beobachteten Anlagerung von $OH^\bullet$ -Radikalen an aromatische oder heterocyclische Aminosäurereste um die inaktivierende Reaktion handelt. Obgleich die Aminosäureanalyse zeigt, daß nach dieser ersten Anlagerung der OH -Radikale an Tyrosin und Histidin, die im Übergangsspektrum zu erkennen war, die weitere Reaktion zum Abbau dieser beiden Aminosäuren führt, kann man daraus nicht schließen, daß die Strahleninaktivierung der Ribonuclease durch eine Modifikation von Tyrosin und Histidin bedingt ist. Durch chemische Modifikation der Histidinreste in der Ribonuclease konnte zwar nachgewiesen werden, daß zwei der vier Histidinreste zum enzymatischen Zentrum gehören /69/, doch sind die von uns gefundenen G-Werte für den Histidinabbau (Tabelle 7) zu niedrig, um daraus folgern zu können, daß die Strahleninaktivierung der Ribonuclease vor allem durch diese Reaktion bewirkt wird.

Ähnliche pulsradiolytische Untersuchungen über den Angriff der Primärradikale auf Ribonuclease wurden auch von Lichtin, Ogdan und Stein /43/ ausgeführt. Für die Reaktion der Elektronen wird ebenfalls aufgrund der Absorption bei 400 nm im Übergangsspektrum eine Anlagerung an die Disulfidbindung angenommen. Für $H^\bullet$ - und $OH^\bullet$ -Radikale wird wegen eines Absorptionsmaximums bei 300 nm wie bei Adams eine Anlagerung an Tyrosin, Phenylalanin und Histidin vermutet. Erstmals wird in dieser Arbeit nachgewiesen, daß durch die Abstraktion eines H-Radikals durch ein $OH^\bullet$ -Radikal vom C_α in der Peptidkette ein Radikal von der Form

$\begin{array}{c} \text{-C-NH-}\dot{\text{C}}(\text{R})\text{-C-} \\ \text{"} \quad \quad \text{"} \\ \text{O} \quad \quad \text{O} \end{array}$ entsteht, für das ein Übergangsspektrum mit einem intensiven, scharfen Absorptionsmaximum um 245 nm und einem breiteren und schwächeren Maximum bei 350 - 400 nm charakteristisch ist. Nach ihren Messungen schätzen die Autoren, daß etwa 20 % der OH'-Radikale in dieser Weise reagieren.

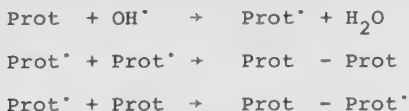
In seiner Arbeit zeigt Lichtin, daß das Übergangsspektrum, das 10 μ s nach dem Bestrahlungspuls beobachtet wird, sich mit der Zeit ändert. Es wird dabei angenommen, daß diese Änderung durch intramolekulare Umlagerungen hervorgerufen werden. Mit Hilfe der pulsradiolytischen Untersuchungen kann aber keine Aussage darüber gemacht werden, zu welcher stabilen Modifikation des Proteins die H-Abstraktion vom C $_{\alpha}$ in der Peptidkette führt.

Bei der Strahlenchemie des Acetylgylicin (s. 1.3.3) konnte von Garrison /29/ bereits gezeigt werden, daß es bei der Einwirkung von OH'- oder H'-Radikalen auf Acetylgylicin auch zur Ausbildung von C $_{\alpha}$ -Radikalen kommen muß (Gl. 30 und 31), die dann vorzugsweise unter Dimerisierung weiterreagieren (Gl. 32). Es kann aber auch zur Disproportionierung kommen, wodurch aus Acetylgylicin Essigsäure, Ammoniak und Ameisensäure entsteht (Gl. 33 und 34). Entsprechend diesen Reaktionen müßte beim Protein nach der H-Abstraktion vom C $_{\alpha}$ -Atom die Weiterreaktion zur Dimerisierung oder Polymerisierung führen, wodurch größere Molekülaggregate entstehen. Es könnte aber auch zur Disproportionierung der C $_{\alpha}$ -Radikale kommen und damit zum Bruch der Peptidkette.

Bei unseren Untersuchungen über die strahleninduzierten Modifikationen der Ribonuclease fanden wir häufig die Aggregation. Dagegen konnte die Entstehung von Proteinbruchstücken nicht beobachtet werden. So trat bei der Bestrahlung unter N $_2$ und unter N $_2$ O der Verlust der enzymatischen Aktivität stets begleitet von einer Zunahme des Aggregates in der bestrahlten Enzymprobe auf. Da in einer früheren Arbeit /15/ auch nachgewiesen werden konnte, daß die aggregierten Moleküle eine sehr viel geringere spezifische Aktivität haben als die monomeren

Proteinmoleküle, wurde zunächst angenommen, daß der Aggregationsprozeß von Bedeutung für die Inaktivierung ist. Bei den hier vorgelegten Untersuchungen zeigte sich aber, daß bei der Strahleninaktivierung in Gegenwart von Aethanol keine Aggregation auftritt. Die Inaktivierung muß also durch eine andere molekulare Veränderung als die Zusammenlagerung der Enzymmoleküle bewirkt worden sein.

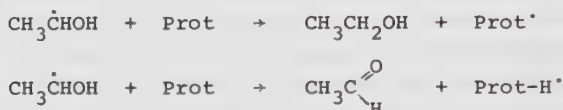
Mee, Adelstein und Stein fanden ebenfalls, daß bei Bestrahlung in Gegenwart eines OH-Fängers kein Aggregat auftritt. Da sie ebenfalls - auch in Übereinstimmung zu unseren Ergebnissen - bei Erhöhung der Anzahl der OH-Radikale eine Verstärkung der Aggregation nachwiesen, nehmen sie an, daß die Aggregation durch die Reaktion der OH-Radikale bewirkt wird, wobei sie voraussetzen, daß t-Butanolradikale nicht mit Ribonuclease reagieren. Da durch Radiolyse bei pH 2,5 in Gegenwart von t-Butanol die Ribonuclease nicht aggregiert, wird daraus geschlossen, daß H-Radikale nicht die Aggregation auslösen können. Nach der Auffassung von Mee, Adelstein und Stein greifen die OH-Radikale bevorzugt an der Proteinoberfläche an, wodurch dann intermolekulare Verknüpfungen durch Radikal-Radikal- oder Radikal-Molekülreaktionen ermöglicht werden:



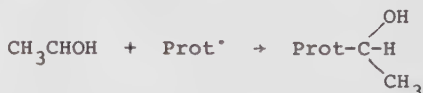
Da diese Reaktion sehr unspezifisch ist, soll die Reaktion der OH[•]-Radikale wohl zur Aggregation aber nicht zur Inaktivierung führen. Hingegen soll nach Meinung dieser Autoren die Reaktion der H-Radikale nur an bestimmten Gruppen erfolgen, die möglicherweise auch im Inneren des Moleküls liegen. Daher sollen die Reaktionen der H-Radikale mit den Ribonucleasemolekülen wohl zur Inaktivierung, nicht aber zur Aggregation beitragen. Diese Aussage zum Reaktionsmechanismus war gemacht worden unter der Voraussetzung, daß t-Butanolradikale nicht mit Proteinen reagieren. Aufgrund unserer Ergebnisse und auch wegen der auf S. 91 erwähnten Experimente muß man allerdings an der Richtig-

keit dieser Voraussetzung zweifeln.

Da für die Aethanolradikale eindeutig nachgewiesen wurde, daß sie mit Proteinen reagieren, kann zumindest in dem hier untersuchten System der von Mee u.a. vorgeschlagene Reaktionsmechanismus nicht zutreffen. Durch Oxidation oder Reduktion des Aethanolradikals können in einem ersten Reaktionsschritt Proteinradikale entstehen:



Da es auch sterischen Gründen sehr unwahrscheinlich ist, daß die Aethanolradikale in das Innere der Proteinmoleküle eindringen können, sollten - wie es auch bei der Reaktion der $\text{OH}^{\cdot}$ -Radikale angenommen wird - die Radikalstellen an der Oberfläche des Proteinmoleküls gebildet werden. Daher sollten wie nach dem Angriff von $\text{OH}^{\cdot}$ -Radikalen auch bei Proteinradikalbildung durch Aethanolradikale, die Folgereaktionen, die zur Aggregatbildung führen, möglich sein. Das Ausbleiben der Aggregatbildung läßt sich nur damit erklären, daß nicht Proteinradikale miteinander reagieren, sondern Protein- und Aethanolradikale eine intermolekulare Verknüpfung eingehen entsprechend der folgenden Gleichung:



Eine weitere mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Aggregation beim Bestrahlen in Gegenwart eines Alkohols kann noch sein, daß nur die $\text{OH}^{\cdot}$ -Radikale unter Abstraktion des H-Radikals vom C_α in der Peptidkette reagieren und daß diese Reaktion notwendige Voraussetzung für die Aggregation ist.

In diesem Abschnitt wurden als strahleninduzierte Modifikationen der Enzymmoleküle die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung und die Aggregation besonders im Hinblick auf die Inaktivierung diskutiert. In beiden Fällen konnte eine eindeutige

Korrelation zwischen molekularer Veränderung und Inaktivierung nicht aufgezeigt werden. Als weitere strahleninduzierte Veränderung des Enzymmoleküls, die aber in dieser Arbeit und auch von anderen Autoren noch nicht untersucht wurde, ist noch der Bruch der Peptidkette möglich. Diese Reaktion kann nach Garrison als Folgereaktion nach der Ausbildung des C_{α} -Radikals auftreten, wenn an Stelle der Dimerisierung eine Disproportionierung erfolgt (s. Gl. 33 und 34). Obgleich nach der Radiolyse der Ribonuclease gelchromatographisch keine Bruchstücke festgestellt werden konnten, kann diese Disproportionierungsreaktion dennoch abgelaufen sein, da im Fall der Ribonuclease auch nach einigen Brüchen in der Peptidkette das Molekül durch die vier Disulfidbrücken, sowie durch H-Brücken und hydrophobe Wechselwirkung als Einheit noch erhalten bleibt. Für den Fall der Lactatdehydrogenase ist uns der Nachweis von strahleninduzierten Brüchen in der Peptidkette bereits gelungen /70/.

4.3 Unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der beiden enzymatischen Funktionen

Ein interessantes Verhalten der Ribonuclease bei der Radiolyse das in dieser Arbeit beobachtet wurde, ist die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der beiden Funktionen des Enzyms.

Aufgrund einer Arbeit von Smith und Adelstein /52/ wurde bis jetzt angenommen, daß die beiden Funktionen beim Bestrahlen in gleichem Maße inaktiviert werden. Diese Aussage beruht auf einer Dosis-Effekt-Kurve, die nach dem Bestrahlen einer Ribonuclease-Lösung von einer Konzentration von 1 mg/ml unter Verwendung von RNS und cyclischem Cytidinphosphat als Substrat gewonnen wurde. Wie auch aus unseren Messungen (s. Abb. 8) zu sehen ist, kann in diesem Konzentrationsbereich keine unterschiedliche Inaktivierung gefunden werden. Auch nach Bestrahlung unter N_2O ist ein Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit der beiden Funktionen über den gesamten Konzentrationsbereich nicht meßbar (s. Tab. 2). Verhindert man aber die strahleninduzierte Aggregation durch die Zugabe von Aethanol, so zeigt

sich ein erheblicher Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit der beiden Funktionen (s. Abb. 8 und Tabelle 2). In den hier untersuchten Fällen erwies sich immer die Hydrolasefunktion als strahlenempfindlicher als die Depolymerasefunktion. Dieser Unterschied läßt vermuten, daß entweder zur Katalyse der Hydrolase mehr Gruppen des Enzyms benötigt werden, oder daß nur die Katalyse für Cytidinphosphat nicht aber die für Uridinphosphat beeinträchtigt wird.

Nach den Arbeiten von Kalnitzky /71/ war man zunächst der Ansicht, daß es bei der Ribonuclease nur ein katalytisches Zentrum gibt, da unter verschiedenen Bedingungen die beiden Funktionen mit gleicher Geschwindigkeit zerstört werden. Scheraga /72/ weist aber darauf hin, daß durch chemische Modifikation die Ribonuclease unterschiedliche Aktivität gegenüber den beiden Substraten annehmen kann. Auch von anderen Autoren /73/, /74/, /75/ konnten Derivate mit spezifischen Veränderungen am Molekül hergestellt werden, bei denen sich die Funktionen in ihrer Aktivität unterscheiden. Bis jetzt hat man noch zu wenige Ergebnisse, um erkennen zu können, welche Gruppen für die Katalyse der Depolymerisationsreaktion und welche für die Hydrolyse benötigt werden. Durch den Prozeß der Aggregation wird offenbar die Aktivität der Depolymerasefunktion zusätzlich vermindert, so daß unter Bestrahlungsbedingungen, bei denen Aggregate auftreten, ein Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit der beiden Funktionen nicht mehr meßbar ist. Diese Annahme wird auch durch Ergebnisse einer früheren Arbeit /46/ wahrscheinlich, in der gezeigt werden konnte, daß beim strahleninduzierten Aggregat die spezifische Aktivität der Hydrolase noch relativ hoch war, während kaum noch eine Katalyse des Depolymerisationsprozesses durch das Aggregat meßbar war.

Auch Crestfield /76/ kann zeigen, daß Ribonuclease-Aggregate, die durch Gefriertrocknen saurer Lösungen entstehen, weiterhin enzymatische Aktivität zeigen, wenn cyclisches Cytidinphosphat als Substrat verwendet wird. Leider wurde in diesem Fall nicht die Aktivität in bezug auf die Depolymerisierung gemessen.

Von anderen Autoren, die über die Radiolyse der Ribonuclease gearbeitet haben, wurde die Inaktivierung jeweils nur einer Funktion gemessen. In den meisten Fällen wurde die enzymatische Bestimmung für die Hydrolasefunktion durchgeführt. Daher kann dieses Ergebnis der hier vorgelegten Arbeit nicht mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit soll beitragen zur Aufklärung des Mechanismus bei der Inaktivierung der Enzyme durch Radio-lyse.

Zunächst wurde die Inaktivierung beider Enzymfunktionen der Ribonuclease durch alle entstehenden Primärradikale des Wassers untersucht. Dazu wurden Dosis-Effekt-Kurven nach Bestrahlung unter N_2 an Ribonuclease-Lösungen von unterschiedlicher Konzentration aufgenommen. Die Inaktivierung der Ribonuclease wurde dann in gleicher Weise nach Bestrahlung unter N_2O untersucht. Durch N_2O werden die hydratisierten Elektronen in $OH^\bullet$ -Radikale umgewandelt, so daß unter dieser Bedingung etwa die doppelte Menge an OH -Radikalen wie unter N_2 vorliegen, während das Verhältnis von $OH:H$ -Radikalen ungefähr 10:1 ist. Das Abfangen der hydratisierten Elektronen wirkt sich in den meisten Fällen als ein Strahlenschutz aus, nur bei Ribonucleasekonzentration $> 10^{-4}$ M findet man unter N_2O niedrigere D_{37} -Werte für die Inaktivierung der Hydrolase als unter N_2 . Bestrahlt man Ribonuclease in Gegenwart von 10^{-2} M Aethanol, so reagieren nur noch etwa 15 % der ursprünglich vorhandenen $OH^\bullet$ -Radikale mit der Ribonuclease. Das Abfangen der $OH^\bullet$ -Radikale durch Aethanol wirkt sich als Strahlenschutz für die beiden Funktionen aus, wobei unter diesen Bedingungen die Hydrolasefunktion strahlenempfindlicher ist als die Depolymerasefunktion. Erhöht man die Konzentration des Aethanols auf 10^{-1} M, so werden alle $OH^\bullet$ -Radikale und die Hälfte aller vorhandenen $H^\bullet$ -Radikale abgefangen. Obgleich nun weniger Primärradikale vorhanden sind als in Gegenwart von 10^{-2} M Aethanol, verändern sich die D_{37} -Werte durch die Erhöhung der Fänger-substanz nicht. Auch das zusätzliche Abfangen der hydratisierten Elektronen durch N_2O , wirkte sich nicht als Erhöhung des Strahlenschutzes aus. In allen untersuchten Fällen zeigten die D_{37} -Werte mit guter Korrelation eine lineare Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Da experimentell nachgewiesen wird, daß nicht nur eine Radikalsorte die Inaktivierung des Enzyms

bewirkt, eignet sich die Gleichung von Sanner und Pihl nicht für die Interpretation der Meßergebnisse. Abschätzungen für die Effektivität der reagierenden Primärradikale ergaben, daß OH-Radikale und hydratisierte Elektronen in etwa gleichem Maße zur Inaktivierung beitragen, während sich in dem untersuchten System kein Beitrag der H'-Radikale nachweisen läßt. Es kann aber gezeigt werden, daß Aethanolradikale, die durch das Abfangen von OH'- und H'-Radikalen durch Aethanol entstehen, mit der Ribonuclease reagieren und dabei auch Inaktivierung bewirken müssen.

Diese Reaktion der Aethanolradikale, die aufgrund der Inaktivierung der Ribonuclease durch Radiolyse angenommen wird, kann experimentell unter Verwendung von ^{14}C -Aethanol nachgewiesen werden. Durch die Radiolyse wird radioaktives Aethanol an die Ribonuclease gebunden und kann nach der Gelfiltration in der Proteinfraction nachgewiesen werden. Die Menge gebundenen Aethanols steigt mit der Dosis an und hängt von den Bestrahlungsbedingungen ab.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Strahleninaktivierung wurde weiterhin untersucht, welche strahleninduzierten Veränderungen am Enzymmolekül auftreten. Dazu wurde die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung durch Radiolyse bei unterschiedlichen Bedingungen bestimmt. Es zeigte sich, daß unter allen Bedingungen Cystin, Methionin, Tyrosin, Histidin und Lysin durch die Radiolyse abgebaut werden. Es ließ sich allerdings keine Korrelation zwischen dem Abbau einer Aminosäure und der Strahleninaktivierung nachweisen.

Weiterhin wurde noch das Aggregationsverhalten der Ribonuclease bei der Radiolyse untersucht. Nach Bestrahlung unter N_2O war die Aggregation am stärksten ausgeprägt, während sich nach der Bestrahlung in Gegenwart von Aethanol auch mit hohen Dosen und auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von N_2O kein Aggregat nachweisen ließ. Es wird angenommen, daß durch OH-Radikale Reaktionen ausgelöst werden, die Aggregation zur Folge haben, wäh-

rend die Reaktion der Aethanolradikale die Aggregation des Proteins verhindern. Da Strahleninaktivierung des Enzyms erfolgt, ohne daß gleichzeitig Aggregation nachweisbar ist, kann diese strahleninduzierte Modifikation nicht im Zusammenhang mit der Inaktivierung des Enzyms stehen. Als mögliche strahleninduzierte Reaktion, die die Inaktivierung des Enzyms bedingt, wird der Bruch in der Peptidkette angesehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- /1/ H. Fricke und B. W. Petersen, Strahlentherapie 26, 329 (1927)
- /2/ W.M. Dale, Radiat. Biol. 1, 255 (1954)
- /3/ W.M. Dale, Brit. J. Radiol. 16, 171 (1943)
- /4/ W.M. Dale, Biochem. J. 36, 80 (1942)
- /5/ J. Weiss, Nature London 153, 748 (1944)
- /6/ F. S. Dainton und D. B. Peterson, Proc. Roy. Soc London 267 A, 443 (1962)
- /7/ E. J. Hart und J. W. Boag, J. Amer. chem. Soc. 84, 4090 (1962)
- /8/ J. P. Keene, Nature London 197, 47 (1963)
- /9/ F. Hutchinson und D. A. Ross, Radiat. Res. 10, 447 (1959)
- /10/ L. Augenstein, Radiat. Res. 10, 89 (1959)
- /11/ T. Sanner und A. Pihl, Europ. J. Biochem. 1, 33 (1967)
- /12/ T. Sanner und A. Pihl, BBA 146, 298 (1967)
- /13/ L. G. Augenstein, Symposium on information theory in biology (N.Y. Pergamon, Press (1958), S. 287
- /14/ K. Dose, Biophysik 1, 316 (1964)
- /15/ H. Schüßler und H. Jung, Z. Naturforsch. 22 b, 614 (1967)
- /16/ H. Jung und H. Schüßler, Z. Naturforsch. 21 b, 224 (1966)

- /17/ H. Schüßler, Biophysik 9, 315 (1973)
- /18/ H. Pauly und Ch. Eggert, studia biophysica 7, 31 (1968)
- /19/ J. G. Draganie und Z. D. Draganie, "The Radiation Chemistry of Water" Physical Chemistry Series Monographs Vol. 26 (Academic Press, New York 1971)
- /20/ E. D. Black und E. Hayon, J. Phys. Chem. 74, 3199 (1970)
- /21/ J. Liebster und J. Kopoldová, Adv. Radiat. Biology 1, 157 (1964)
- /22/ W. M. Garrison, Current Topics in Radiat. Res. 4, 43 (1968)
- /23/ P. Neta, M. Simic und E. Hayon, J. Phys. Chem. 74, 1214 (1970)
- /24/ R. Braams, Radiat. Res. 27, 319 (1966)
- /25/ G. Scholes, P. Shaw, R. L. Wilson und M. Ebert, Pulse Radiolysis (Academic Press, 1965), S. 151
- /26/ C. Vermeil und M. Lefort, Compt. rend. 244, 889 (1957)
- /27/ J. Rowbottom, J. biol. Chem. 212, 877 (1955)
- /28/ J. Kopoldová, J. Liebster und E. Groß, Radiat. Res. 30, 261 (1967)
- /29/ W. M. Garrison, Curr. Top. Radiat. Res. 4, 43 (1968)
- /30/ H. L. Atikins, W. Bennet-Corniea und W. M. Garrison, J. Phys. Chem. 71, 772 (1967)
- /31/ M. Simic, P. Neta und E. Hayon, J. Amer. chem. Soc. 92, 4763 (1970)

- /32/ R. Braams, Radiat. Res. 31, 8 (1967)
- /33/ M. Simic und E. Hayon, Radiat. Res. 48, 244 (1971)
- /34/ C. H. W. Hirs, S. Moore und W. H. Stein, J. biol. Chem. 235, 633 (1960)
- /35/ H. A. Scheraga und J. A. Rupley, Adv. Enzymology 24, 162 (1962)
- /36/ C. H. W. Hirs, S. Moore und W. H. Stein, J. biol. Chem. 200, 493 (1953)
- /37/ J. T. Potts, D. M. Young, C. B. Anfinsen und A. Sandoval, J. biol. Chem. 239, 3781 (1964)
- /38/ F. M. Richards und P. J. Vitahayathil, J. biol. Chem. 234, 1259 (1959)
- /39/ H. Fricke, J. chem. Phys. 3, 60 (1935)
- /40/ D. Frankenberg, Phys. Med. Biol. 14, 597 (1969)
- /41/ D. H. Spackman, H. W. Stein und S. Moore, Analyt. Chem. 30, 1190 (1958)
- /42/ A. Henglein, Einführung in die Strahlenchemie (Verlag Chemie, 1969)
- /43/ N. N. Lichtin, J. Ogdan und G. Stein BBA 276, 124 (1972)
- /44/ W. M. Dale, J. V. Davies und W. J. Meredith, Brit. J. Cancer 3, 31 (1949)
- /45/ E. E. Schrier, R. R. Ingwall und H. A. Scheraga, J. Phys. Chem. 69, 298 (1965)

- /46/ H. Schübler, Int. J. Radiat. Biol. 23, 175 (1973)
- /47/ G. E. Adams, R. L. Wilson, J. E. Aldrich und R. B. Cundall, Int. J. Radiat. Biol. 16, 333 (1969)
- /48/ G. E. Adams, R. L. Wilson, R. H. Bisby und R. B. Cundall, Int. J. Radiat. Biol. 20, 405 (1971)
- /49/ G. Gorin, L. Papapoulou und L. W. Tai, Int. J. Radiat. Biol. 15, 33 (1969)
- /50/ L. K. Mee, S. J. Adelstein und G. Stein, Radiat. Res. 52, 588 (1972)
- /51/ D. E. Hoard, F. N. Hayes und W. B. Goad, 5th Int. Congress of Radiat. Res. (1974)
- /52/ T. W. Smith und S. J. Adelstein, Radiat. Res. 24, 119 (1965)
- /53/ C. Streffer, Strahlenbiochemie (Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1969)
- /54/ E. Slobodian, W. Newman, M. Fleischer und S. Rubinfeld, BBA 111, 181 (1965)
- /55/ B. E. Holmes, G. Newton und G. Stein, Nature 213, 1087 (1967)
- /56/ R. Shapira und G. Stein, Science 162, 1489 (1968)
- /57/ H. Jung und H. Schübler, Z. Naturforsch. 23 b, 934 (1967)
- /58/ K. R. Lynn und W. J. Skinner, Radiat. Res. 57, 358 (1974)
- /59/ R. Offinger, Doktorarbeit, Erlangen

- /60/ T. Brustad, Proceedings of 3rd Int. Congress of Radiat. Res. S. 384 (1967)
- /61/ J. Hermans und H. A. Scheraga, J. Amer. chem. Soc. 83, 3283 (1961)
- /62/ G. E. Adams und J. L. Redpath, Int. J. Radiat. Biol. 25, 129 (1974)
- /63/ K. R. Lynn und D. Louis, Int. J. Radiat. Biol. 23, 477 (1973)
- /64/ G. M. Gaucher, B. L. Mainmann, G. P. Thompson und D. A. Armstrong, Radiat. Res. 46, 457 (1971)
- /65/ P. B. Roberts, Int. J. Radiat. Biol. 24, 143 (1973)
- /66/ T. Masuda, J. Ovadia und L. J. Grossweiner, Int. J. Radiat. Biol. 20, 447 (1971)
- /67/ G. E. Adams, K. F. Baverstock, R. B. Cundall und J. L. Redpath, Radiat. Res. 54, 375 (1973)
- /68/ R. Badiello, M. Tamba und M. Quintiliani, Int. J. Radiat. Biol. 26, 311, (1974)
- /69/ A. M. Crestfield, W. H. Stein und S. Moore, J. biol. Chemie, 238, 2413 (1963)
- /70/ H. Schüssler, Niemczyk, M. Eichhorn und H. Pauly, Int. J. Radiat. Biol., im Druck
- /71/ G. Kalnitsky, J. P. Hummel, H. Resnik, J. R. Carter, L. B. Barnett und C. Dierks, Ann. New York Acad. Sci. 81, 542 (1959)
- /72/ H. A. Scheraga u. J. A. Rupley, Adv. Enzym. 24, 173 (1962)

- /73/ F. H. White, Federation Proc. 20, 221 (1961)
- /74/ D. Wellner, H. J. Silman und M. Sela, J. biol. Chem. 238, 1324 (1963)
- /75/ H. Neumann, J. Z. Steinberg, J. R. Brown, R. F. Goldberger und M. Sela, European J. Biochem. 3, 171 (1967)
- /76/ A. M. Crestfield, W. H. Stein und S. Moore, Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 217 (1962)

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN SYMBOLE

α	Proportionalitätsfaktor für pro Dosiseinheit gebildete Radikale
B	Konzentration von Puffer und Verunreinigungen
b	$\frac{1}{D_{37}}$
D	Dosis
D_{37}	Dosis, bei der noch 37 % der Restaktivität vorhanden sind
D_{37}^P	D_{37} gemessen in Gegenwart eines Protektors
E	Konzentration des aktiven Enzyms
E_i	Konzentration des inaktiven Enzyms
E_0	Anfangskonzentration des Enzyms
G	$\frac{\text{Zahl der gebildeten oder verbrauchten Moleküle}}{\text{absorbierte Strahlenenergie in eV}} \times 100$
G_i	$\frac{\text{Zahl der gebildeten Wasserradikale}}{\text{absorbierte Strahlenenergie in eV}} \times 100$
I	Konzentration der Wasserradikale, die pro Zeiteinheit gebildet werden
k	Geschwindigkeitskonstante
k_B	Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Wasserradikale mit den Verunreinigungen und mit dem Puffer
k_E	Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Wasserradikale mit dem aktiven Enzym
k_{Ei}	Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Wasserradikale mit dem inaktivierten Enzym
k_i	Geschwindigkeitskonstante für die Inaktivierung des Enzyms

- k_p Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Wasserradikale mit der zugesetzten Schutzsubstanz
- P Konzentration des Schutzstoffes oder des Radikalfängers
- t Zeit
- x_j Konzentration der Wasserradikale j

Geschwindigkeitskonstanten

R e a k t i o n	k (M ⁻¹ sec ⁻¹)	Literaturstelle
Ribonucl. + e _{aq} ⁻	1,0 · 10 ¹⁰	N.N. Lichtin, J. Ogden und G. Stein, Biochimica biophysica Acta <u>276</u> , 124 (1972)
Ribonucl. + OH [•]	2,4 · 10 ¹⁰	
Ribonucl. + H [•]	1,5 · 10 ¹⁰	w.o. Biochimica bio- physica Acta <u>263</u> , 14 (1972)
N ₂ O + e _{aq} ⁻	8,7 · 10 ⁹	NSRDS - NBS 43
C ₅ H ₅ OH + OH [•]	1,1 · 10 ⁹	M. Anbar und P. Neta Int. J. appl. Radiat. Isotopes <u>18</u> , 493 (1967)
(CH ₃)COH + OH [•]	2,5 · 10 ⁸	"
C ₂ H ₅ OH + H [•]	1,6 · 10 ⁷	"
(H [•] CysOH) ₂ + e _{aq} ⁻	1,3 · 10 ¹⁰	"
H [•] Tyr·OH + OH [•]	5,8 · 10 ⁹	"
H [•] Met·OH + OH [•]	4,9 · 10 ⁹	"
H [•] His·OH + e _{aq} ⁻	3,9 · 10 ⁹	"
H [•] Phe·OH + OH [•]	3,5 · 10 ⁹	"
(H [•] CysOH) ₂ + OH [•]	3,2 · 10 ⁹	"
H [•] His·OH + OH	3,0 · 10 ⁹	"

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990